

Analyse von Glykosaminoglykanen in humanen Zellen und Körperflüssigkeiten

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Michael Ambrosius
aus Bielefeld

Bielefeld / Bad Oeynhausen
November 2008

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von

Prof. Dr. med. Knut Kleesiek

am

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum
in Bad Oeynhausen

in der Zeit von

November 2005 bis November 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Kleesiek
2. Gutachter: Prof. Dr. T. Dierks

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Knut Kleesiek danke ich für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für sein fortwährendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Christian Götting für die vielen hilfreichen Anregungen und Ratschläge, die gute Betreuung dieser Arbeit und seine ständige Bereitschaft zu wissenschaftlichen Diskussionen.

Dr. Jens Dreier, Dr. Martin Gastens, Dr. Doris Hendig, Dr. Joachim Kuhn, Dr. Christian Prante, Dr. Michael Schmidt, Dr. Melanie Störmer, Dipl.-Biol. Susanne Busch, Dipl.-Biol. Javier C. Casanova, Dipl.-Biochem. Benjamin Müller, Dipl.-Biotech. Claudia Pönighaus, Dipl.-Biochem. Christina Roch, Dipl.-Biotech. Tanja Vollmer, Dipl.-Biochem. Ralf Zarbock, Alexandra Adam, Marlen Ewald, Christoph Lichtenberg und Anne-Kathrin Vollmer danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Meinen ehemaligen Blockpraktikanten Katharina Merx und Taisiya Staben danke ich für ihren Beitrag am Fortgang meiner Arbeit.

Allen Mitarbeitern im Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Mein herzlicher Dank gilt meiner Frau Yahong, meinem Sohn Yang und meinen Eltern für die stete und verständnisvolle Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Summary	2
2	Einleitung	3
2.1	Proteoglykane	3
2.2	Glykosaminoglykane	4
2.3	Glykosyltransferasen	7
2.4	Xylosyltransferasen	8
2.5	Analytik der Glykosaminoglykane	10
2.6	Gegenstand der Arbeit	14
3	Ergebnisse	15
3.1	Entwicklung einer Methode zur Analyse von Glykosaminoglykan Δ-Disacchariden	15
3.1.1	Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung von Glykosaminoglykan Δ -Disacchariden	15
3.1.2	Evaluierung der HPLC-Methode	19
3.1.3	Aufreinigung von Glykosaminoglykanen aus biologischen Proben	22
3.2	Analytik der Glykosaminoglykan Δ-Disaccharide von Blutzellen	28
3.2.1	Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Erythrozyten	28
3.2.2	Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Thrombozyten	28
3.2.3	Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Granulozyten	30
3.3	Analytik der Glykosaminoglykan Δ-Disaccharide von humanen Zellkulturlinien	34
3.3.1	Bestimmung der Gesamtmenge der Glykosaminoglykane in humanen Zelllinien	34

3.3.2	Analytik der Δ -Disaccharid-Komposition in humanen Zelllinien	36
3.4	Auswirkungen von Polymorphismen in <i>XYLT1</i> und <i>XYLT2</i> auf die Konzentration und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane im Serum	41
3.4.1	Untersuchung eines Blutspenderkollektives auf Polymorphismen	41
3.4.2	Analytik der Glykosaminoglykane im Serum	43
3.4.3	Bestimmung der XT-Aktivität im Serum	44
4	Diskussion	47
4.1	Entwicklung einer Methode zur Analyse von Glykosaminoglykan Δ-Disacchariden	47
4.1.1	Eigenschaften der Methode im Kontext der Literatur	47
4.1.2	Aufreinigung von Glykosaminoglykanen aus biologischen Proben	49
4.2	Aufreinigung von Blutzellen mit anschließender Glykosaminoglykan-Analytik	51
4.2.1	Aufreinigung und Analyse der Glykosaminoglykane von Erythrozyten	51
4.2.2	Aufreinigung und Analyse der Glykosaminoglykane von Thrombozyten	51
4.2.3	Aufreinigung und Analyse der Glykosaminoglykane von Granulozyten	52
4.3	Analytik der Glykosaminoglykan Δ-Disaccharide von humanen Zellkulturlinien	54
4.4	Einfluss von Polymorphismen in <i>XYLT1</i> und <i>XYLT2</i> auf die Glykosaminoglykane im Serum	57
4.5	Ausblick	59
5	Methoden	60
5.1	Gewinnung von Blutzellen und Serum	60
5.1.1	Gewinnung von Serum aus Vollblut	60
5.1.2	Isolierung von Erythrozyten	60
5.1.3	Isolierung von Thrombozyten aus EDTA-Blut	60
5.1.4	Isolierung von Granulozyten aus EDTA-Blut	60

5.2	Glykosaminoglykan-Analytik	61
5.2.1	Isolierung der Glykosaminoglykane aus Probenmaterial	61
5.2.2	Derivatisierung mit 2-Aminoacridon (AMAC)	62
5.2.3	HPLC-Analytik	62
5.3	Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität	63
5.3.1	Radiochemischer XT-Test	63
5.3.2	XT-Aktivitätstest mittels HPLC-Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie (HPLC-ESI-MS)	64
5.4	Zellkultur	65
5.4.1	Zelllinien und Zellmedien	65
5.4.2	Auftauen von Zelllinien	66
5.4.3	Passagieren von Zellen	67
5.4.4	Zellernte und Zellzahlbestimmung	67
5.4.5	Kryokonservierung von Zellen	68
5.5	Molekularbiologische Methoden	68
5.5.1	Aufreinigung von DNA aus Vollblut	68
5.5.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	69
5.5.3	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion	69
5.5.4	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	71
5.5.5	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	72
5.5.6	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	73
5.5.7	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen	74
5.6	Statistik	76
6	Material und Geräte	77
6.1	Zelllinien	77
6.2	Zellkulturmedien, -lösungen und -reagenzien	78
6.3	Reagenzien, Enzyme, Antikörper	78
6.4	Reagenziensätze	80
6.5	Software	80
6.6	Sonstige Materialien	80
6.7	Puffer und Lösungen	80
6.8	Geräte	81

6.9	Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	82
7	Abkürzungen	83
7.1	Abkürzungen für Aminosäuren	83
7.2	Abkürzungen für Basen	83
7.3	Sonstige Abkürzungen	83
8	Literatur	87
9	Publikationen und Präsentationen	96
9.1	Publikationen	96
9.2	Kongressbeiträge und Posterpräsentationen	96
9.3	Kongressvorträge	98

1 Zusammenfassung

Glykosaminoglykane (GAGs) sind nicht nur Bestandteile der extrazellulären Matrix, sondern übernehmen darüber hinaus als Bestandteil von Proteoglykanen wichtige Funktionen bei der Vermittlung und Steuerung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Dabei spielt die Abfolge der Δ -Disaccharide in den GAGs eine entscheidende Rolle für die Funktion. Die humanen Xylosyltransferasen XT-I und XT-II katalysieren den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Bildung der GAGs am *Core*-Protein von Proteoglykanen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine HPLC-Methode entwickelt, um 16 verschiedene GAG Δ -Disaccharide nach Derivatisierung mit dem Fluorophor 2-Aminoacridon quantitativ zu bestimmen. Damit können die GAGs Hyaluronsäure (HA), Chondroitinsulfat (CS), Dermatan-sulfat (DS), Heparansulfat (HS) und Heparin (H) quantitativ in ihrer Δ -Disaccharid-Zusammensetzung analysiert werden. Im Vergleich zu allen vorherigen HPLC-Methoden zur Trennung derivatisierter Δ -Disaccharide wurden mit der neuen Methode erstmalig 16 verschiedene Δ -Disaccharide in zwei Trennläufen mit nur einem Puffersystem und einer Säule unter Basislinientrennung der *Peaks* aufgetrennt. Zusätzlich konnten erstmalig alle 9 kommerziell erhältlichen Δ -Disaccharide der GAGs HA, CS und DS nach Markierung mit einem Fluorophor in einem singulären HPLC-Lauf aufgetrennt werden. Weiterhin konnten die benötigten Zeiträume für den Trennlauf der Δ -Disaccharide von HA, CS und DS sowie den Trennlauf der Δ -Disaccharide von HS und H in Relation zu allen vergleichbaren Literaturmethoden deutlich verkürzt werden.

Die Isolierung und Analyse von GAGs aus Blutzellen erfolgte zur Erstcharakterisierung und zur Untersuchung der Eignung bestimmter Blutzellen als Probenmaterial für die GAG-Analytik. Um Thrombozyten und Granulozyten mit hoher Reinheit und Zellzahl aus dem Vollblut von Blutspendern zu isolieren, wurden optimierte Aufreinigungsmethoden mit Dichtegradientenzentrifugation entwickelt und erfolgreich eingesetzt. Die durchschnittliche Reinheit betrug für die Thrombozytenproben 99,4% und für die Granulozytenproben 98,3%. Es wurde zum ersten Mal der Normalbereich der GAG Δ -Disaccharide in Thrombozyten und Granulozyten bestimmt. Es erfolgte die Erstcharakterisierung der Δ -Disaccharide von GAGs in Granulozyten mit dem Nachweis von Δ di-mono4S_{CS} und Δ di-0S_{HA} als Hauptkomponenten. Die GAG Δ -Disaccharide von 22 verschiedenen, humanen Zellkulturzelllinien wurden zur Erstcharakterisierung und zu Vergleichen zwischen Zelllinien verschiedener Gewebetypen analysiert. Es wurde ein signifikant verminderter GAG-Gehalt in den 5 untersuchten Suspensionszelllinien (Blastome, hämatookologische Tumorzelllinien) im Vergleich zu den 17 adhärenenten Zelllinien (Karzinome, Sarkome, Fibroblasten) vorgefunden ($p = 0,03$). Dabei waren insbesondere die Werte für die GAGs HS/H in Suspensionszellen erniedrigt. Des Weiteren zeigte sich in Suspensionszelllinien für das Δ -Disaccharid Δ di-0S_{HS} ein signifikant erniedrigter ($p = 0,006$) und für Δ di-di(6,N)S_{HS} ein signifikant erhöhter ($p = 0,0002$) prozentualer Anteil an der Komposition von HS/H im Vergleich zu den adhärenenten Zelllinien. Die Δ -Disaccharide Δ di-mono6S_{HS} und Δ di-di(2,N)S_{HS} wurden ausschließlich in den adhärenenten Zelllinien detektiert.

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von Polymorphismen der Xylosyltransferase (*XYLT*)-Gene auf die GAG-Konzentration und GAG-Komposition im Serum wurden 223 Blutspender auf 3 Polymorphismen in *XYLT1* und *XYLT2* untersucht, die jeweils mit einer Aminosäure-Substitution einhergehen. Bei 23 Proben mit einem der drei Polymorphismen und 25 Kontrollproben erfolgte die Analyse der GAG Δ -Disaccharide im Serum. Dabei zeigte sich eine signifikante Assoziation ($p < 0,01$) zwischen dem Polymorphismus *XYLT1* Exon 1 c.343G>T und erniedrigten Werten für die GAG-Konzentration im Serum im Vergleich zum Wildtyp.

1.1 Summary

Glycosaminoglycans (GAGs) are found mainly in connective tissue as constituents of proteoglycans, covalently linked to the core protein. They participate in and regulate several cellular events and physiological processes. The sequence of Δ -disaccharides in GAGs is crucial for their proper function. The human xylosyltransferases XT-I and XT-II catalyse the initial and rate-limiting step in the biosynthesis of GAGs by the transfer of xylose to selected serine residues in the core protein of proteoglycans (PGs).

For the analysis of GAGs, a HPLC method facilitating the separation of 16 Δ -disaccharide standards derivatized with the fluorophore 2-aminoacridone was developed. This novel method allows the quantitative analysis of the Δ -disaccharide composition of hyaluronic acid (HA), chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), heparan sulfate (HS) and heparin (H). The method represents the first HPLC application ever to accomplish baseline separation of either seven Δ -disaccharides from HS/H or nine Δ -disaccharides from CS/DS/HA with one column and buffer system after fluorophore labeling in two runs. This is also the first HPLC method achieving the separation of all nine fluorophore-labeled GAG Δ -disaccharides from CS/DS/HA in one run. The run times are shorter compared to any existing HPLC separation of labeled GAG Δ -disaccharides from either CS/DS/HA or HS/H. Since only conventional HPLC apparatus is needed our method can be used for routine GAG disaccharide analysis in every laboratory.

In order to evaluate the newly developed method, GAGs from different blood cells were characterized. Optimized methods with good recovery and high purity were developed for the purification of platelets and granulocytes using gradient centrifugation and were successfully applied. The average purities were 99.4% for platelet samples and 98.3% for granulocyte samples. For the first time, normal ranges of the GAG Δ -disaccharide compositions from platelets and granulocytes were determined. The composition of GAG Δ -disaccharides from granulocytes was characterized for the first time and Δ di-mono4S_{CS} and Δ di-0S_{HA} were identified as the main components.

Furthermore, the Δ -disaccharide compositions of GAGs from 22 different human cell lines were analysed for differences in the total GAG amount between the investigated adherent and suspension cell lines. For the 5 suspension cell lines investigated (blastoma cell lines and hematological cancer cell lines), a significantly decreased total GAG amount was found compared to the 17 adherent cell lines (carcinoma cell lines, sarcoma cell lines and fibroblast cell lines) ($p = 0.03$). The amounts of HA, CS/DS and HS/H were decreased in the suspension cell lines with only the amount of HS/H being significantly decreased ($p = 0.037$) in suspension cell lines in comparison with adherent cell lines. The percentage of Δ di-mono0S_{HS} was found to be significantly decreased ($p = 0.006$) in suspension cell lines compared to adherent cell lines. The percentage of Δ di-di(6,N)S_{HS} was significantly increased ($p = 0.0002$) in suspension cell lines in comparison with adherent cell lines. Δ di-mono6S_{HS} and Δ di-di(2,N)S_{HS} were exclusively detected in the adherent cell lines.

In order to examine changes in the serum GAGs concentration and composition caused by polymorphisms in the xylosyltransferase genes *XYLT1* and *XYLT2*, 223 blood donors were screened for 3 missense polymorphisms in *XYLT1* and *XYLT2*. 48 samples comprising 23 case samples in which one of the missense mutations had been found and 25 wildtype/control samples were analyzed for their serum GAGs and XT activity. Here, it could be shown that the SNP c.343G>T is associated with a significantly ($p < 0.01$) reduced GAG amount compared to the wildtype group.

2 Einleitung

2.1 Proteoglykane

Proteoglykane (PGs) bilden eine Klasse von stark glykosylierten Glykoproteinen. Sie bestehen aus einem *Core*-Protein mit kovalent gebundenen Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten. Die Größe der *Core*-Proteine von Proteoglykanen variiert von 10 kDa bis über 500 kDa, wobei zwischen einer und bis zu über 100 Glykosaminoglykan-Ketten an das *Core*-Protein gebunden sind. Proteoglykane sind neben den Faserproteinen Kollagen und Fibronectin ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (ECM), welche bei allen Grundgewebetypen zu finden ist. Weiterhin befinden sich Proteoglykane auf Zelloberflächen und auch intrazellulär [1]. In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass Proteoglykane neben ihrer wichtigen Funktion als Strukturkomponenten auch an vielen physiologischen Prozessen wie der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung teilnehmen und auch regulierende Funktionen ausüben [2].

Gut 30 verschiedene PG *Core*-Proteine sind bisher identifiziert worden. Basierend auf der Grundstruktur der *Core*-Proteine konnten mehrere Proteoglykan-Familien klassifiziert werden. Syndekane sind Typ 1 Transmembranproteine, von denen in Säugern die Syndekane 1 bis 4 bekannt sind [3]. Sie werden auf der Oberfläche aller adhärenen Zellen exprimiert. Die extrazelluläre Domäne kann 3 bis 5 Glykosaminoglykan-Ketten beinhalten. Eine weitere Proteoglykan-Familie stellen die Glypikane dar, welche in Säugern sechs verschiedene *Core*-Proteine umfassen [4]. Glypikane sind am C-Terminus über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker an die Zellmembran gebunden. Die Glykosaminoglykan-Ketten sind im Bereich ihrer C-terminalen 50 Aminosäurereste gebunden. Darüber hinaus gibt es Proteoglykane, die ein Bestandteil der ECM sind und keine direkte Bindung an die Zellmembran haben, wie Agrin, Typ XVIII Kollagen, Perlecan und Aggrecan.

Aggrecan wird von Chondrozyten synthetisiert und ist das Hauptproteoglykan im Gelenkknorpel [5]. Etwa 160 Glykosaminoglykan-Ketten sind an ein Aggrecan-*Core*-Protein gebunden. Aggrecan ist nicht-kovalent an Hyaluronsäure-Ketten gebunden. Die Glykosaminoglykane des Aggrecans und die Hyaluronsäure bilden die Hauptbestandteile der ungeformten Interzellulärsubstanz im Knorpel. Sie ziehen aufgrund ihres polyanionischen

Charakters Natriumkationen und folglich auch Wasser in das Knorpelgewebe. Dadurch erhält der Knorpel seine hohe Druckelastizität.

Proteoglykane von verschiedenen menschlichen Zelllinien sind aufgereinigt und untersucht worden. Das Heparansulfat-Proteoglykan Perlecan wird von verschiedenen Zellarten wie Epithelzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Chondrozyten exprimiert [6]. Bei der Charakterisierung von Perlecan aus der embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 fand man neben Heparansulfat zum ersten Mal überraschenderweise auch Chondroitinsulfat und Keratansulfat an das *Core*-Protein von Perlecan gebunden vor [7], nachdem Perlecan lange für ein reines Heparansulfat-Proteoglykan (HSPG) gehalten wurde. In der menschlichen Sarkomazelllinie HT-1080 zeigte sich, dass eine induzierte, verminderte Expression von Perlecan auf der Zelloberfläche zu einem beschleunigten Wachstum der Zellen führte [8]. Die Zellen bildeten größere Kolonien in Agar und zeigten eine schnellere Tumorbildung in immundefizienten Mäusen im Vergleich zu normalen HT-1080 Zellen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit HT-1080 Zellen, zeigte sich für die Prostatakrebszelllinie LNCAP eine positive Korrelation zwischen der Expression von Perlecan und einer schnelleren Zellproliferation mit einem erhöhten metastatischem Potential [9]. Zusätzlich führte die Inhibierung der Expression von Perlecan in LNCAP Zellen zu einem verminderten Zellwachstum.

Proteoglykane spielen eine bedeutende Rolle bei der Anheftung und Invasion von humanen Zellen durch Bakterien, Viren und Parasiten [10]. Im Zellkulturmodell konnte gezeigt werden, dass die Anheftung von *Staphylococcus aureus* an die Endothelzelllinie EA.hy926 und die Epithelzelllinie A-549 zum Teil auf der Präsenz von Heparansulfat-Proteoglykanen auf der Zelloberfläche beruht [11].

2.2 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane sind negativ geladene, lineare Heteropolysaccharide, welche hauptsächlich im Bindegewebe als Bestandteil von Proteoglykanen zu finden sind. Glykosaminoglykane bestehen aus einer variablen Anzahl von sich wiederholenden Disaccharideinheiten. Die Disaccharide sind wiederum aus einer Uronsäure (D-Glukuronsäure, D-Iduronsäure) oder Galaktose und einem Hexosamin (D-Galaktosamin oder D-Glukosamin) aufgebaut. Die Vielfalt der Disaccharideinheiten wird dazu noch durch

Sulfatierungen mit bis zu drei Sulfatgruppen in unterschiedlichen Positionen erhöht. In Abhängigkeit von den Untereinheiten ihrer Disaccharide und der Verknüpfung zwischen ihren Disaccharideinheiten werden Glykosaminoglykane in vier unterschiedliche Gruppen eingeteilt:

- (1) Hyaluronsäure (HA),
- (2) Chondroitinsulfat (CS) und Dermatansulfat (DS),
- (3) Heparansulfat (HS) und Heparin (H),
- (4) Keratansulfat (KS) [12] (Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Einteilung der Glykosaminoglykane basierend auf ihren Disaccharideinheiten und den Verknüpfungen zwischen den Disaccharideinheiten.

Gruppe Nr.	Abkürzung	erste Einheit	zweite Einheit	Verknüpfung
1	HA	D-Glukuronsäure	D-Glukosamin	$\beta(1\rightarrow4)$
2	CS	D-Glukuronsäure	D-Galaktosamin	$\beta(1\rightarrow4)$
	DS	D-Iduronsäure	D-Galaktosamin	$\beta(1\rightarrow4)$
3	HS	D-Glukuronsäure	D-Glukosamin	$\alpha(1\rightarrow4)$
	H	D-Iduronsäure	D-Glukosamin	$\alpha(1\rightarrow4)$
4	KS	Galaktose	D-Galaktosamin	$\beta(1\rightarrow3)$

Die Glycosaminoglykane Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und Heparin werden über den Tetrasaccharidlinker β -D-Glukuronido-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galaktosido-(1 \rightarrow 3)- β -D-Galaktosido-(1 \rightarrow 4)- β -D-Xylosido O-glykosidisch an bestimmte Serinreste des *Core*-Proteins gebunden [13]. Der initiale Schritt bei der Bildung des Tetrasaccharidlinkers wird von den Xylosyltransferasen I und II katalysiert.

Die Hyaluronsäure ist mit einem Molekulargewicht von 10^5 bis 10^7 Da das längste Glykosaminoglykan [14]. Hyaluronsäure ist in allen Geweben von Vertebraten zu finden und bildet die Grundlage der perizellulären Matrix [15]. Im Gegensatz zu den Glykosaminoglykanen der Gruppen 2 bis 4 wird Hyaluronsäure nicht sulfatiert und nicht als Teil eines Proteoglykans synthetisiert. Hyaluronsäure wird an der Innenseite der Plasmamembran von den drei Hyaluronsäure-Synthasen aufgebaut, wobei die Hyaluronsäure-Kette durch die Zellmembran in den perizellulären Raum geführt wird.

Hyaluronsäure kann über einen Zelloberflächenrezeptor wie CD44 oder RHAMM an die Zelloberfläche gebunden werden.

Die Disaccharide der Gruppen 2 bis 4 werden als Bestandteil eines Proteoglykans im Golgi-Apparat synthetisiert und mittels Exocytose aus der Zelle transportiert. Chondroitinsulfat wird in CS-A, CS-B und CS-C unterteilt, wobei CS-A reich an Disacchariden mit Sulfatierung am C-4 des Galaktosamins ist und CS-C vorwiegend aus Disacchariden mit Sulfatierung am C-6 des Galaktosamins besteht [16]. CS-B besteht hauptsächlich aus Dermatansulfat, wobei neben der C5-Epimerisierung der Glukuronsäure zur Iduronsäure auch Sulfatierungen am C-4 und C-6 des Galaktosamins und am C-2 der Iduronsäure als Modifizierungen auftreten. CS-D aus dem Haiknorpel und CS-E aus dem Knorpel von Tintenfische sind mehrfach sulfatierte Chondroitinsulfate.

Heparansulfat-Proteoglykane bilden auf der Zelloberfläche Andockstellen für eine Vielzahl von Proteinliganden [17]. Sowohl Syndekane als auch Glypikane werden in hoher Anzahl auf Zelloberflächen exprimiert, wo sie mit Wachstumsfaktoren, Enzymen, Enzyminhibitoren, Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und mikrobiellen Proteinen interagieren [18]. Die Heparansulfat-Ketten werden aus üblicherweise 25 bis 200 Disaccharideinheiten gebildet. Sie werden durch mehrere aufeinanderfolgende Schritte, wie N-Deacetylierung, N-Sulfatierung, C5-Epimerisierung von Glukuronsäure zu Iduronsäure und O-Sulfatierungen modifiziert [19]. Dabei erfolgen die C5-Epimerisierung und O-Sulfatierungen gehäuft nach vorhergehender N-Deacetylierung mit N-Sulfatierung. Da die Diversität der Heparansulfat-Ketten einer strengen Kontrolle unterliegt, wird vermutet, dass Heparansulfat eine selektive Interaktion mit Proteinliganden eingehen kann.

Keratansulfat wird in Keratansulfat I und II (KSI und KSII) unterteilt, wobei Keratansulfat I zuerst in der Hornhaut gefunden wurde und über Asparaginreste N-glykosidisch an das *Core*-Protein gebunden ist [20]. Keratansulfat II wird auch als Knorpel-Keratansulfat bezeichnet und ist O-glykosidisch an Serin- oder Threoninreste gebunden.

Veränderungen der Menge, Verteilung und Zusammensetzung von Glykosaminoglykanen wurden bei mehreren Erkrankungen wie Arteriosklerose, Krebs, Diabetes mellitus, Morbus Basedow, Interstitieller Zystitis und Osteoarthritis nachgewiesen [21-26]. Sowohl im Serum von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 als auch Morbus Basedow wurden deutlich erhöhte

Werte von Glykosaminoglykanen im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden [23, 24, 27]. Im Urin von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von Glykosaminoglykanen im Vergleich zu gesunden Probanden [28], welche zusätzlich mit der Ausprägung der Mikroangiopathie der Patienten korrelierte.

Die Kultivierung von humanen Zelllinien dient als ein Modell für die Untersuchung von physiologischen Prozessen und Krankheiten und ergänzt damit die Untersuchungen am Patienten. Die Rolle der Glykosaminoglykane bei z.B. Krebs, Tumorwachstum und Osteoarthritis wurde im Zellkulturmodell untersucht [29-31].

2.3 Glykosyltransferasen

Glykosyltransferasen (GT; EC 2.4.x.y) bilden eine große Enzymfamilie, welche an der Biosynthese von Oligosacchariden, Polysacchariden, Glykoproteinen und Glykolipiden beteiligt sind [32]. Ein Großteil der Glykosyltransferasen transferieren Zuckerreste von einem aktivierten Nukleotidzuckerrest auf spezifische Akzeptoren unter Ausbildung von glykosidischen Bindungen [33]. Im Allgemeinen zeigen die Glykosyltransferasen sowohl für den Glykosyldonor als auch den Akzeptor eine sehr hohe Spezifität. Der Akzeptor kann ein Zucker, ein Lipid oder ein Protein sein [34]. Die meisten Glykosyltransferasen benötigen für ihre katalytische Aktivität ein zweiwertiges Kation als Kofaktor, wie Mg^{2+} oder Mn^{2+} [35]. Die im Golgi-Apparat lokalisierten Glykosyltransferasen sind Typ II Transmembran-Proteine, die aus einer kurzen N-terminalen cytoplasmatischen Domäne, einer hydrophoben Transmembranregion, einer Stammregion variabler Länge und einer großen globulären katalytischen Domäne am C-terminalen Bereich bestehen [36] (Abb. 2.1).

Alle Glykosyltransferasen können, je nachdem ob der Transfer des Zuckers unter Inversion oder Retention der Konfiguration am anomeren Zentrum erfolgt, in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden. Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz sind die humanen Glykosyltransferasen in 78 Familien unterteilt worden, wobei sowohl die Zahl der neuentdeckten Glykosyltransferasen als auch deren Familien stetig wächst. Zwischen den Glykosyltransferasen einer Familie können sich große Unterschiede bezüglich der Funktion zeigen. Es gibt mehrere Beispiele von Glykosyltransferasen mit sehr hoher Sequenzhomologie, die dennoch wesentliche Unterschiede in der Art der katalysierten Reaktion zeigen [37]. Basierend auf der Röntgenkristallstruktur gibt es drei strukturelle

Superfamilien von Glykosyltransferasen. Die Glykosyltransferasen der Familie A (GT-A) weisen alle ein DXD-Motiv auf (X = beliebige Aminosäure) und benötigen divalente Kationen für ihre Aktivität [38]. Das DXD-Motiv interagiert mit der Phosphatgruppe des aktivierten Zuckerrestes. Das katalytische Zentrum der Glykosyltransferasen der Familie B (GT-B) befindet sich zwischen zwei Rossmann-Domänen. Es ist noch unklar, ob die GT-B generell für ihre katalytische Aktivität ein divalentes Kation wie Mn^{2+} benötigen. GT-B besitzen kein DXD-Motiv.

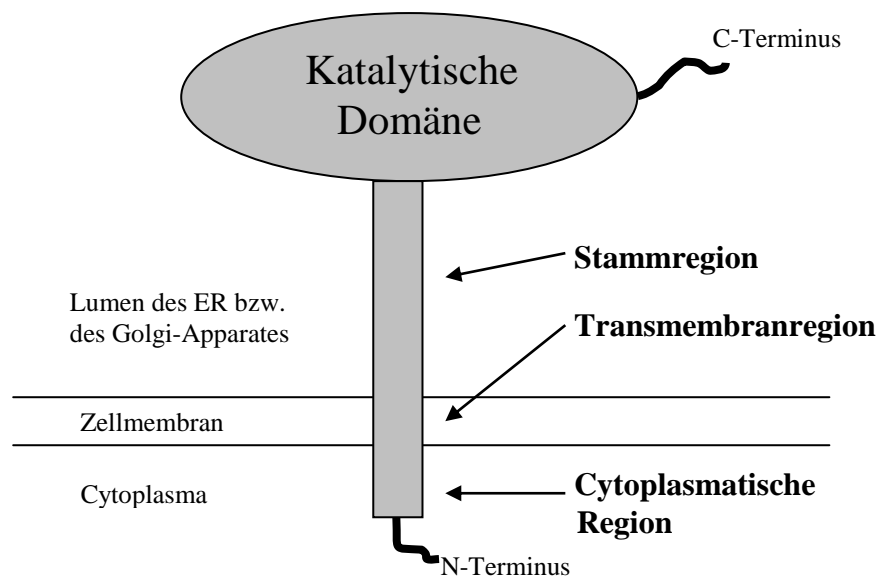


Abb. 2.1 Domänenstruktur der Glykosyltransferasen.

Die dritte Superfamilie ist erst seit einigen Jahren bekannt [39] und zeichnet sich durch ein α -Helix/ β -Faltblatt/ α -Helix-Sandwich ohne DXD-Motiv aus.

2.4 Xylosyltransferasen

Die Xylosyltransferasen I und II (XT-I, XT-II, EC 2.4.2.26) sind Typ II Transmembran-Proteine und in den Zisternen des cis-Golgi-Netzwerks lokalisiert [40]. XT-I besitzt ein DXD-Motiv, welches für die katalytische Funktion des Enzyms benötigt wird [41]. XT-I und XT-II katalysieren den initialen Schritt bei der Bildung des Tetrasaccharid-Linkers für die Glykosaminoglykane der Gruppen 2 und 3 [42-44]. Dabei wird D-Xylose von dem aktivierten Substrat UDP-Xylose auf spezifische Serinreste im *Core*-Protein übertragen.

Durch Vergleiche von Glykosylierungsstellen in verschiedenen *Core*-Proteinen konnte die komplette Erkennungssequenz, bestehend aus der Abfolge der Aminosäuren a-a-a-a-G-S-G-a-b-a (a = E oder D, b = G, E oder D), bestimmt werden [45]. Basierend auf dieser Consensus-Sequenz erfolgte erstmalig die Etablierung spezifischer Testsysteme zur Quantifizierung der XT-I-Enzymaktivität [46]. Mit rekombinantem Bikunin und dem Seidenfibroin von *Bombyx mori* als Akzeptor konnte ein spezifischer und hochsensitiver, radiochemischer Enzymaktivitätstest entwickelt werden. Das Seidenfibroin besteht zu 60% aus der repetitiven Erkennungssequenz S-G-A-G-A-G. Dieser Test wurde später durch einen schnelleren und einfacheren LC-MS/MS XT-Aktivitätstest ergänzt [47]. Die Aktivitätstests ermöglichen die Bestimmung der XT-Aktivität in Körperflüssigkeiten wie Serum oder in Zellkulturüberständen. Dadurch konnte erstmals gezeigt werden, dass die XT-Aktivität in Körperflüssigkeiten bei vielen physiologischen und pathobiochemischen Prozessen, die mit Veränderungen im Proteoglykan-Stoffwechsel einhergehen, signifikant verändert ist [46, 48-54]. Für bestimmte Polymorphismen in den Xylosyltransferase (*XYLT*)-Genen konnte weiterhin ein Bezug zu pathobiochemischen Prozessen bei Diabetes mellitus und Pseudoxanthoma elasticum aufgezeigt werden [55-58].

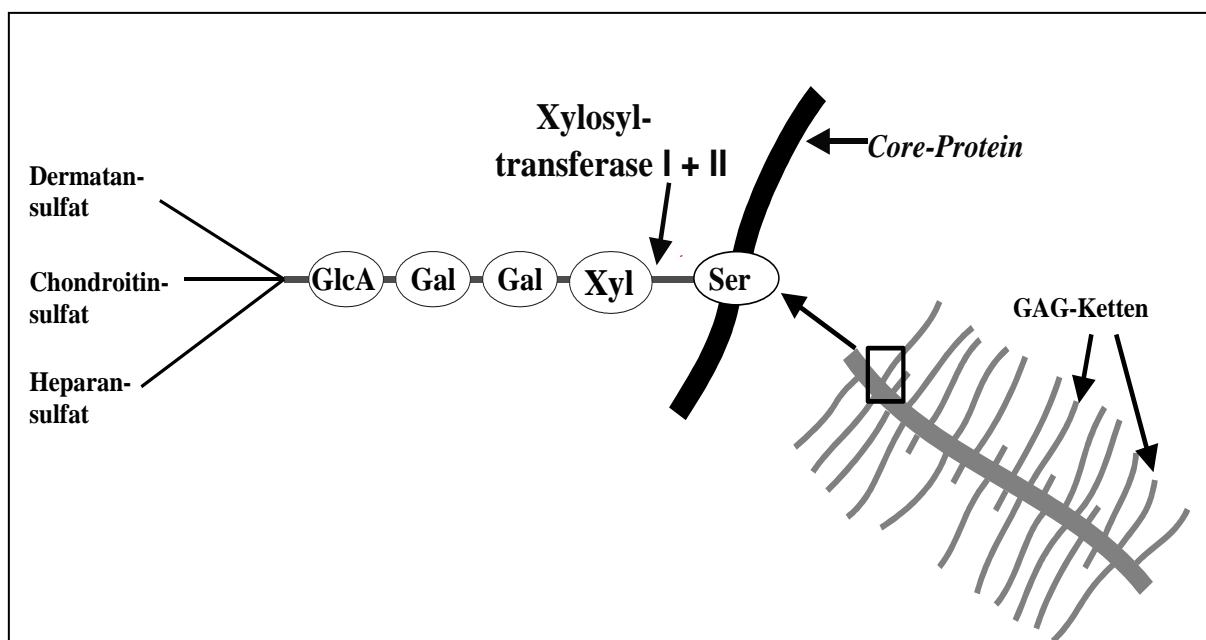


Abb. 2.2 Schematische Darstellung eines Proteoglykans und der Initiation des Aufbaus der Glykosaminoglykane der Gruppen 2 und 3 durch die Xylosyltransferase.

Nach der Klonierung der cDNA von XT-I und XT-II sowie der Isolierung, zeigte sich für die humane XT-II eine Sequenzhomologie von 55% zur humanen XT-I [59-62]. Das *XYLT1*-Gen ist auf dem Chromosom 16p13.1 lokalisiert, besteht aus 12 Exons und hat eine genomische

Größe von über 300 kbp. Es codiert ein Protein mit einer Masse von 108 kDa [63]. Das *XYLT2*-Gen ist auf dem Chromosom 17q21.3-22 lokalisiert, besteht aus 11 Exons und ist 15 kbp groß. Es codiert ein Protein mit einer Masse von 97 kDa. Innerhalb der C-terminalen, katalytischen Domäne beider Proteine besteht eine Sequenzhomologie von über 80%. Zunächst konnte keine katalytische Funktion für die XT-II gezeigt werden. Erst 2007 wurde die enzymatische Aktivität der XT-II nachgewiesen, wobei sich herausstellte, dass die XT-II dieselbe Reaktion wie die XT-I katalysiert und somit ebenfalls den Start der Biosynthese der Glykosaminoglykane der Gruppen 2 und 3 katalysiert [64-67]. Allerdings zeigten sich für XT-I und XT-II Unterschiede in der Effektivität der enzymatischen Reaktion in Bezug auf die verwendeten Akzeptorpeptide.

2.5 Analytik der Glykosaminoglykane

Die Analyse von Glykosaminoglykanen kann sowohl mit intakten Glykosaminoglykanen als auch deren Spaltprodukten durchgeführt werden [2]. Bei der Analyse von intakten Glykosaminoglykanen erhält man Informationen über die Länge und die Ladungsverteilung. Um die Glykosaminoglykane bezüglich ihrer Disaccharid-Zusammensetzung zu untersuchen, erfolgt ein vollständiger, enzymatischer Abbau der Glykosaminoglykane zu ungesättigten Δ -Disacchariden. Eine Vielzahl von Methoden zur Trennung und Analyse der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide wurde entwickelt, wobei vorwiegend chromatographische und elektrophoretische Methoden sowie die Massenspektrometrie genutzt wurden [12, 67-84]. Die massenspektrometrischen Methoden wurden erst in den letzten Jahren publiziert. Mittels laserinduzierter Fluoreszenz-Kapillargelelektrophorese (LIF-CE) konnten in den letzten Jahren Nachweisgrenzen im Attomol-Bereich für Δ -Disaccharide erreicht werden [79, 84, 85].

Durch die Doppelbindung bei Δ -Disacchariden wird für chromatographische und elektrophoretische Methoden eine sensitive UV-Detektion bei 232 nm ermöglicht. Um sowohl die Sensitivität als auch die Selektivität der Detektion zu verbessern, etablierten sich Vor- und Nachsäulen-Derivatisierungen der Δ -Disaccharide mit Fluorophoren, so dass eine Detektion mittels Fluoreszenzdetektor ermöglicht wurde [85]. Nachteile sind eine erschwerte Trennung der Analyten bei der Vorsäulen- und ein erhöhter apparativer Aufwand bei der Nachsäulen-Derivatisierung. Zur Derivatisierung werden Fluorophore wie z.B. 2-Aminoacridon (AMAC), 2-Aminobenzamid oder Anthranilsäure eingesetzt.

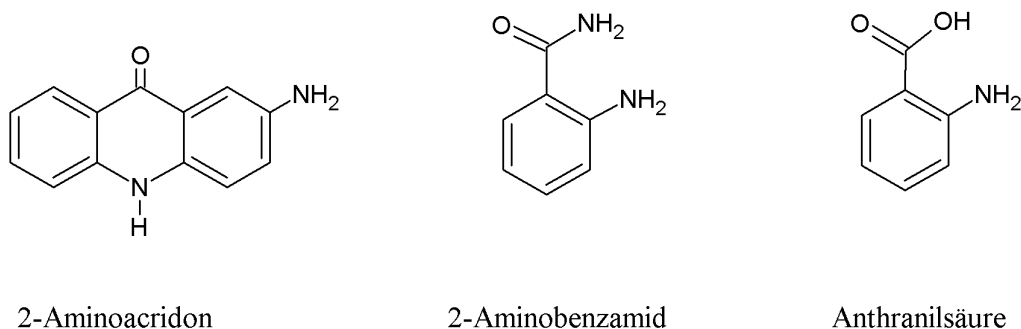


Abb. 2.3 Strukturformeln von Fluorophoren zur Derivatisierung von Δ -Disacchariden.

Die Derivatisierung mit AMAC ist vergleichsweise einfach und die entsprechenden Derivate sind über Monate hinweg bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ stabil [12]. Weiterhin hat sich AMAC sowohl für chromatographische als auch elektrophoretische Trennungen bewährt [79-82].

Die Trennung der vielen verschiedenen Δ -Disaccharide von Glykosaminoglykanen der Gruppen 2 und 3, welche sich zum Teil nur in der Position einer Sulfatgruppe unterscheiden, stellt besondere Herausforderungen an die Trennmethode. Für die Glykosaminoglykane der Gruppe 2 mit Chondroitinsulfat und Dermatan sulfat ergeben sich durch Unterschiede in der Sulfatierung 8 verschiedene Δ -Disaccharide (Tab. 2.2). Für die Glykosaminoglykane der Gruppe 3 mit Heparansulfat und Heparin sind ebenfalls aufgrund unterschiedlicher Sulfatierungen 8 verschiedene Δ -Disaccharide aufzutrennen (Tab. 2.3).

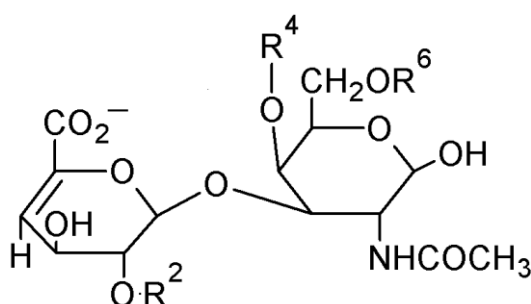


Abb. 2.4 Allgemeine Strukturformel eines Δ -Disaccharides der Gruppe 2 (CS/DS). Es gibt drei Positionen für Sulfatierungen, gekennzeichnet als R^x mit x als Nummer des entsprechenden Kohlenstoffatoms.

Tab. 2.2 Auflistung der 8 Δ -Disaccharide der Gruppe 2 mit dem zugehörigen Sulfatierungsmuster in Bezug auf Abb. 2.4.

Bezeichnung	R^2	R^4	R^6
Δ di-0S _{CS}	H	H	H
Δ di-mono2S _{CS}	SO ₃ ⁻	H	H
Δ di-mono4S _{CS}	H	SO ₃ ⁻	H
Δ di-mono6S _{CS}	H	H	SO ₃ ⁻
Δ di-di(2,4)S _{CS}	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	H
Δ di-di(2,6)S _{CS}	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻
Δ di-di(4,6)S _{CS}	H	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻
Δ di-tri(2,4,6)S _{CS}	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻

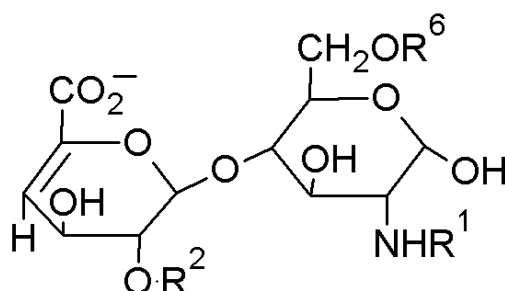


Abb. 2.5 Allgemeine Strukturformel eines Δ -Disaccharides der Gruppe 3 (HS/H). Es gibt drei Positionen für Sulfatierungen, gekennzeichnet als R^x mit x als die Nummer des entsprechenden Kohlenstoffatoms oder Stickstoffatoms.

Tab. 2.3 Auflistung der 8 Δ -Disaccharide der Gruppe 3 mit dem zugehörigen Sulfatierungsmuster in Bezug auf Abb. 2.5.

Bezeichnung	R^1	R^2	R^6
Δ di-0S _{HS}	COCH ₃	H	H
Δ di-mono2S _{HS}	COCH ₃	SO ₃ ⁻	H
Δ di-mono6S _{HS}	COCH ₃	H	SO ₃ ⁻
Δ di-monoNS _{HS}	SO ₃ ⁻	H	H
Δ di-di(2,6)S _{HS}	COCH ₃	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻
Δ di-di(2,N)S _{HS}	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	H
Δ di-di(6,N)S _{HS}	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻
Δ di-tri(2,4,6)S _{HS}	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻

2.6 Gegenstand der Arbeit

Die Xylosyltransferasen I und II katalysieren den initialen Schritt der Biosynthese von Glykosaminoglykan-Ketten in Proteoglykanen. Sie sind die geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme bei dem Aufbau der Glykosaminoglykane.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich genetische Polymorphismen auf die Biosynthese der Glykosaminoglykane im menschlichen Organismus auswirken. Dazu sollte zunächst eine HPLC-Methode zur Analyse der Δ -Disaccharide von Glykosaminoglykanen entwickelt werden, um Glykosaminoglykane aus biologischen Proben isolieren und analysieren zu können. Es sollte untersucht werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen bei der Xylosyltransferase I und/oder II, dem Glykosaminoglykan-Gehalt im Serum und der XT-Aktivität im Serum bei Blutspendern nachweisen lässt.

Zur Charakterisierung der Δ -Disaccharide in verschiedenen Blutzellen sollten Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten aus Vollblut isoliert und hinsichtlich ihrer Glykosaminoglykane analysiert werden. Dabei sollte gezeigt werden, ob die untersuchten Blutzellen für weitere Studien zur Analyse von Glykosaminoglykanen im menschlichen Körper geeignet sind.

Zur Detektion von Unterschieden zwischen verschiedenen Grundtypen von humanen Zellkulturzellen und zur Erstcharakterisierung sollten Glykosaminoglykane aus humanen Zelllinien isoliert und hinsichtlich ihrer Δ -Disaccharid-Zusammensetzung analysiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung einer Methode zur Analyse von Glykosaminoglykan Δ -Disacchariden

Zielstellung war die Entwicklung einer möglichst einfachen, universellen und schnellen Methode zur Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide aus Blutproben und Zellkulturproben. Alle zuvor veröffentlichten Methoden unterlagen einer oder mehreren Einschränkungen wie:

1. Ein begrenztes Spektrum an aufgetrennten Δ -Disacchariden
2. Spezielle oder hohe apparative Anforderungen wie bei der LIF-CE oder Massenspektrometrie
3. Schlechte Auftrennung der Analyten und zu lange Analysenzeiten

Diese Nachteile sollten mit der neuen Methode umgangen werden.

3.1.1 Entwicklung einer HPLC-Methode zur Trennung von Glykosaminoglykan Δ -Disacchariden

Da sich Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide sowohl mit elektrophoretischen, massenspektrometrischen und chromatographischen Methoden trennen lassen, musste zunächst eine Entscheidung hinsichtlich der einzusetzenden Apparatur erfolgen. Der Einsatz einer HPLC-Apparatur ermöglicht bezüglich der Methodenentwicklung Vorteile, da eine breite Auswahl sowohl an HPLC-Säulen mit unterschiedlichsten Trenneigenschaften als auch an Fluoreszenzfarbstoffen genutzt werden kann. Zielstellung war nun die Entwicklung einer HPLC-Methode, welche eine größtmögliche Anzahl von Δ -Disacchariden in kurzer Zeit trennen kann. Die Δ -Disaccharide der Glykosaminoglykangruppen 1, 2 und 3 werden in zwei verschiedenen Läufen getrennt, da eine Trennung aller Δ -Disaccharide in einem Lauf nicht möglich ist. In einem Lauf werden die 9 Δ -Disaccharide der Gruppen 1 (HA) und 2 (CS/DS) getrennt. In einem weiteren Lauf sind 7 Δ -Disaccharide der Gruppe 3 (HS/H) zu trennen. Während in der Literatur vorwiegend HPLC-Methoden zu finden sind, welche auf die Trennung von Δ -Disaccharide der Gruppe 1 und 2 oder der Gruppe 3 spezialisiert sind, sollte die neue Methode ohne große apparative Umstellungen Δ -Disaccharide aller 3 Gruppen trennen.

Zunächst erfolgte die Auswahl eines geeigneten Fluoreszenzfarbstoffes. Dabei wurden 2-Aminoacridon, 2-Aminobenzamid und Anthranilsäure miteinander verglichen.

Tab. 3.1 Vergleich von drei Fluorophoren bezüglich ihres Einsatzes bei der Analytik von Δ -Disacchariden.

Fluorophor	Aufwand bei der Derivatisierung	Intensität der Fluoreszenz	Einsetzbarkeit bei der RP-HPLC
2-Aminoacridon (AMAC)	++	+	++
2-Aminobenzamid (2-AB)	+	+	+
Anthanilsäure (2-AA)	++	++	-

++ = gut geeignet, + = geeignet, - = weniger geeignet

Da für die Auftrennung in erster Linie die hochselektiven und stabilen *reversed-phase* (RP)-Säulen zum Einsatz kommen sollten, fiel die Wahl auf das Fluorophor AMAC, welches mit seinem hydrophoben Dreiringsystem eine Bindung des Analyten an die Oberfläche einer RP-Säule möglich machte. Weiterhin wurden nun verschiedene RP-Säulen auf ihre Fähigkeit zur Auftrennung der mit AMAC derivatisierten Δ -Disaccharide untersucht. Dabei sind auf der Kieselgeloberfläche der Säule verschiedene chemische Gruppen gebunden, welche für die Selektivität der Säule bei der Auftrennung von Analyten maßgebend sind. Die klassische Grundform stellt eine stark hydrophobe Oberfläche mit Oktadekyl(C18)-Gruppen dar. Variationen dieses Grundtyps sind Säulen mit C8- oder C4-Gruppen, sowie Säulen mit Octadekylgruppen, die hydrophile Gruppen beinhalten. Des Weiteren sind zur Erweiterung der Selektivität auch RP-Säulen mit einer Mischung von zwei verschiedenen chemischen Gruppen, wie z.B. C18- und Phenylgruppen, erhältlich.

Da eine Trennung der Δ -Disaccharide mittels C18- und C4-Säulen nicht erfolgreich war, wurden Säulen mit in C18-Gruppen eingebetteten, polaren Gruppen und Säulen mit zwei chemischen Gruppen (C18-Gruppen und Phenylgruppen) getestet, welche jeweils eine deutlich bessere Auftrennung im Vergleich zu den Standardphasen zeigten. Die beste Auftrennung ermöglichte die Säule X-Bridge Shield der Firma Waters. Diese Säule trägt auf ihrer Oberfläche C18-Gruppen mit eingebetteten Carbamoylgruppen (Abb. 3.1).

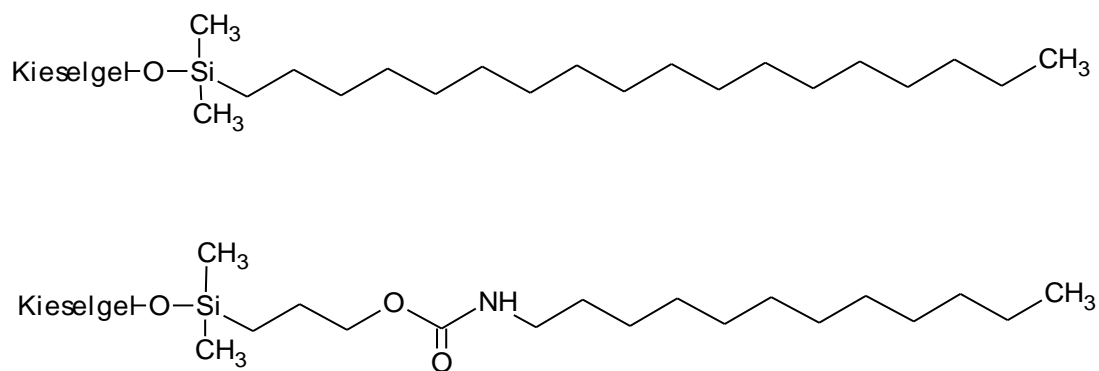


Abb. 3.1 Darstellung einer C18-Gruppe (oben) im Vergleich zu einer C18-Gruppe mit Carbamoylgruppe (unten).

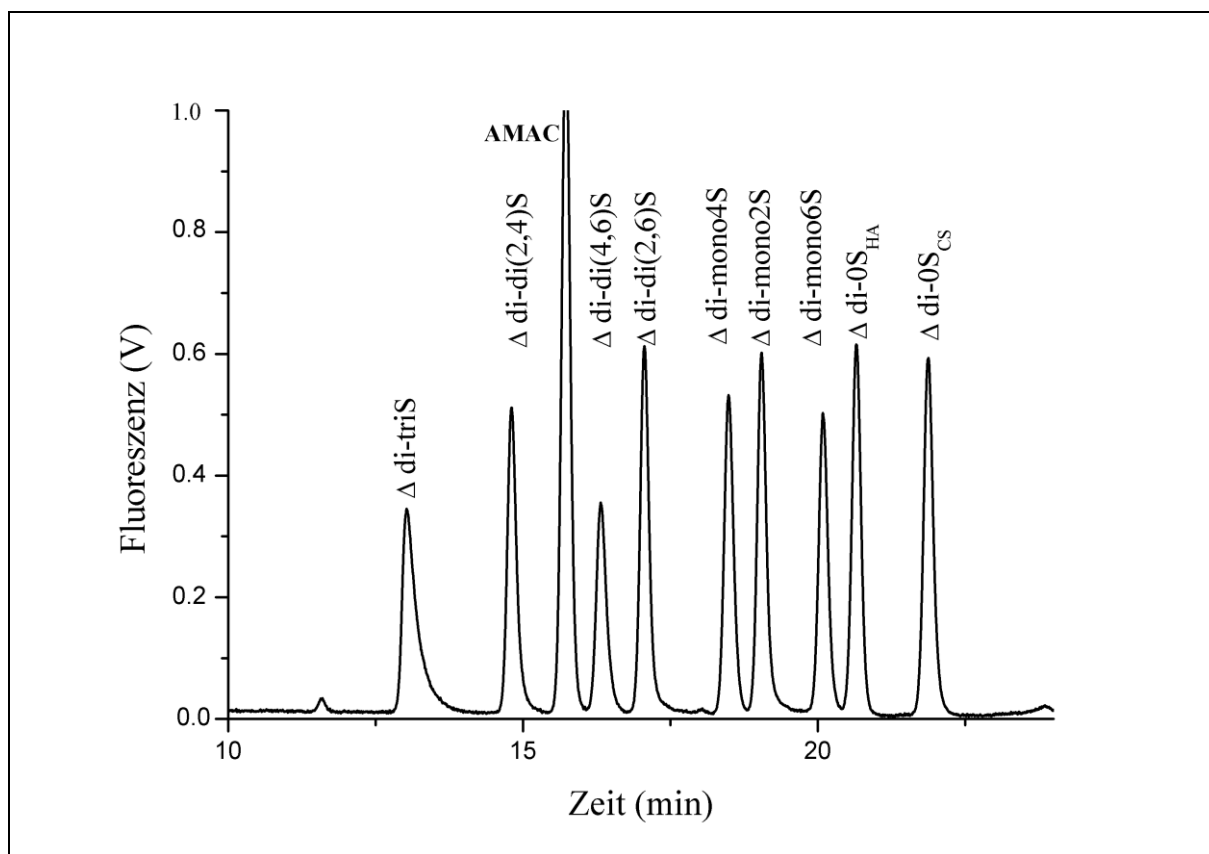


Abb. 3.2 Trennung von 9 mit AMAC derivatisierten Δ -Disaccharid-Standards der Gruppen 1 und 2 mit der RP-HPLC Säule X-Bridge Shield. Jeder *Peak* entspricht einer Injektionsmenge von 4 pmol des jeweiligen Δ -Disaccharid-Standards.

Für die Δ -Disaccharide der Gruppen 1 und 2 konnte eine Basislinientrennung aller 9 Δ -Disaccharide erreicht werden (Abb. 3.2).

Für die Δ -Disaccharide der Gruppe 3 könnte eine Basislinientrennung aller 7 Δ -Disaccharide erreicht werden.

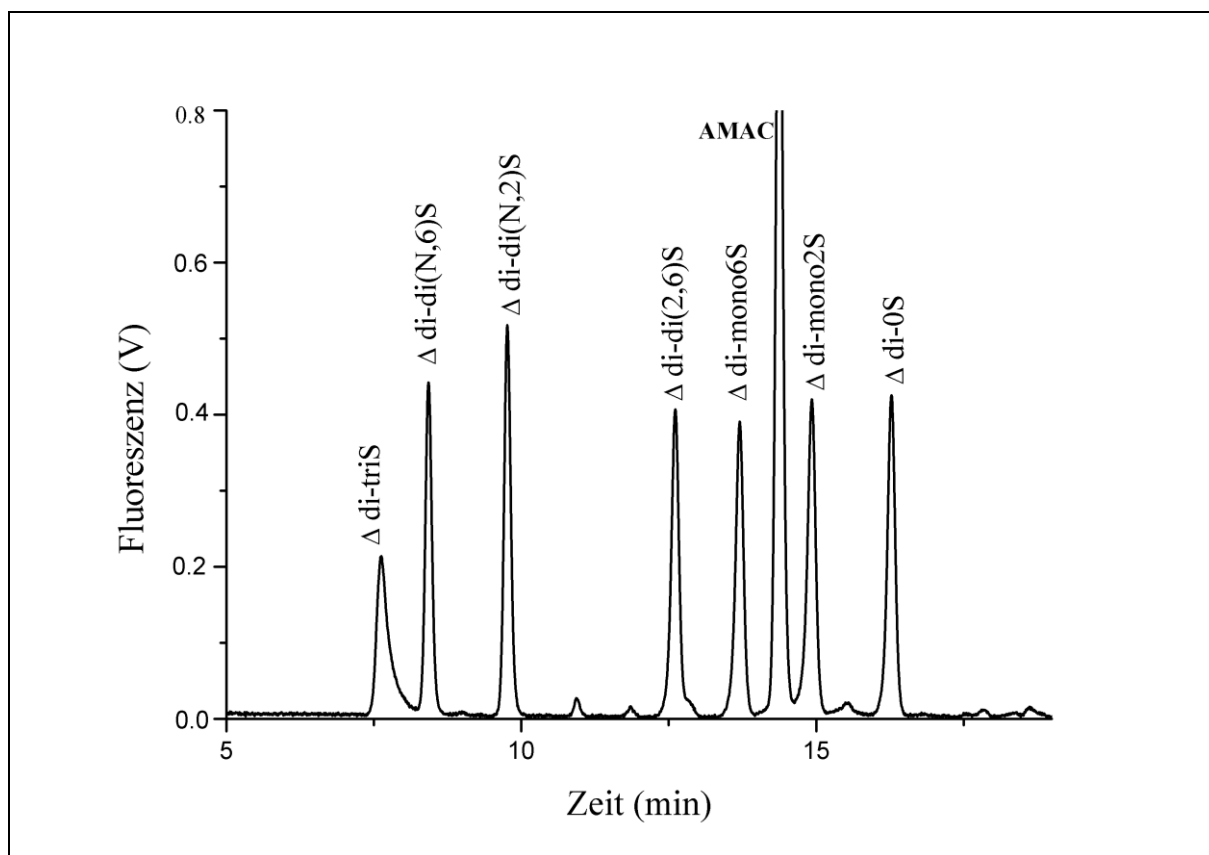


Abb. 3.3 Trennung von 7 mit AMAC derivatisierten Δ -Disaccharid-Standards der Gruppe 3 mit der RP-HPLC Säule X-Bridge Shield. Jeder *Peak* entspricht einer Injektionsmenge von 4 pmol des jeweiligen Δ -Disaccharid-Standards.

Um die in den Abb. 3.2 und 3.3 dargestellten Trennungen zu erreichen, musste der Ammoniumacetatpuffer sowohl in seiner Konzentration als auch seinem pH-Wert optimal eingestellt werden. Danach erfolgte die Auswahl eines optimalen Gradientenvolumens für den Trenngradienten, um den störenden AMAC-*Peak* im Chromatogramm genau zwischen zwei Δ -Disaccharid-*Peaks* zu positionieren. Da hierzu ein relativ großes Gradientenvolumen von 38,2 ml (Trennung der Δ -Disaccharide von HA/CS/DS) bzw. 28,2 ml (Trennung der Δ -Disaccharide von HS/H) benötigt wurde, fiel die Wahl des Säuleninnendurchmessers bei der X-Bridge Shield auf 4,6 mm und nicht 3 mm, um eine schnelle Trennung zu gewährleisten.

3.1.2 Evaluierung der HPLC-Methode

Die Evaluierung wurde gemäß internationaler Vorgaben durchgeführt [86]. Die Derivatisierung der Δ -Disaccharid-Standards erfolgte mit 10 nmol jeden Standards. Eine quantitative Derivatisierung mit AMAC ist in einem Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 nmol gegeben [82]. Zur Erstellung von Kalibrationskurven für die 16 Δ -Disaccharid-Standards wurden die in den Abbildungen 3.2 und 3.3 dargestellten Trennläufe mit Injektionsmengen von 6 pmol, 4,5 pmol, 3 pmol, 1,5 pmol und 0,75 pmol je Δ -Disaccharid-Standard mit jeweils 5 Läufen für jede Konzentration hintereinander durchgeführt. Aus den Mittelwerten zu den gemessenen *Peak*-Flächen wurden die Standardgeraden erstellt, wobei jede Kurve durch den Nullpunkt geführt wurde (Tab. 3.2). Alle Standardkurven weisen einen Korrelationskoeffizienten von $R^2 \geq 0,995$ auf.

Tab. 3.2 Gleichungen der Standardgeraden für die mit AMAC derivatisierten Δ -Disaccharid-Standards der Glykosaminoglykane der Gruppen 1, 2 und 3 (HA, CS und DS sowie HS und H) mit:

x = Zahlenwert der *Peak*-Fläche und y = Injektionsmenge des Δ -Disaccharides in pmol.

HA, CS und DS		HS und H	
Δ -Disaccharid	Geradengleichung	Δ -Disaccharid	Geradengleichung
Δ di-tri(2,4,6) S_{CS}	$y = 6,40 \cdot 10^{-7} \cdot x$	Δ di-tri(2,6,N) S_{HS}	$y = 1,23 \cdot 10^{-6} \cdot x$
Δ di-di(2,4) S_{CS}	$y = 6,10 \cdot 10^{-7} \cdot x$	Δ di-di(6,N) S_{HS}	$y = 1,12 \cdot 10^{-6} \cdot x$
Δ di-di(4,6) S_{CS}	$y = 7,36 \cdot 10^{-7} \cdot x$	Δ di-di(2,N) S_{HS}	$y = 8,98 \cdot 10^{-7} \cdot x$
Δ di-di(2,6) S_{CS}	$y = 4,81 \cdot 10^{-7} \cdot x$	Δ di-di(2,6) S_{HS}	$y = 9,19 \cdot 10^{-7} \cdot x$
Δ di-mono4 S_{CS}	$y = 6,42 \cdot 10^{-7} \cdot x$	Δ di-mono6 S_{HS}	$y = 9,33 \cdot 10^{-7} \cdot x$
Δ di-mono2 S_{CS}	$y = 4,93 \cdot 10^{-7} \cdot x$	Δ di-mono2 S_{HS}	$y = 7,62 \cdot 10^{-7} \cdot x$
Δ di-mono6 S_{CS}	$y = 6,10 \cdot 10^{-7} \cdot x$	Δ di-0 S_{HS}	$y = 8,82 \cdot 10^{-7} \cdot x$
Δ di-0 S_{HA}	$y = 5,46 \cdot 10^{-7} \cdot x$		
Δ di-0 S_{CS}	$y = 5,10 \cdot 10^{-7} \cdot x$		

Ein weiteres Kriterium für eine Methode ist ihre Präzision, welche durch die Abweichungen bei wiederholten Messungen einer Probe bestimmt wird. Die *intraday*-Präzision wird durch zehn aufeinander folgende Messungen bestimmt, während die *interday*-Präzision durch Messungen einer Probe an zehn verschiedenen Tagen ermittelt wird. Bei der Bestimmung der *intraday*-Präzision mit einer Injektionsmenge von je 4 pmol von jedem

Δ -Disaccharid-Standard wurden für die prozentualen Standardabweichungen zwischen den Messungen Werte zwischen 0,58% und 1,66% erreicht (Tab. 3.3).

Tab. 3.3 *Intraday*-Präzision der HPLC-Methode für die mit AMAC derivatisierten Δ -Disaccharid-Standards. Es wurde eine Injektionsmenge von 4 pmol je Standard gewählt. Angegeben ist der Variationskoeffizient (VK), der sich aus der Standardabweichung der *Peak*-Flächen eines Δ -Disaccharides von 10 aufeinander folgenden Messungen ergibt.

<i>Intraday</i> -Präzision			
HA, CS und DS		HS und H	
Δ -Disaccharid	VK [%]	Δ -Disaccharid	VK [%]
Δ di-tri(2,4,6) S_{CS}	0,759	Δ di-tri(2,6,N) S_{HS}	0,97
Δ di-di(2,4) S_{CS}	0,575	Δ di-di(6,N) S_{HS}	0,92
Δ di-di(4,6) S_{CS}	1,66	Δ di-di(2,N) S_{HS}	0,80
Δ di-di(2,6) S_{CS}	0,81	Δ di-di(2,6) S_{HS}	0,92
Δ di-mono4 S_{CS}	0,49	Δ di-mono6 S_{HS}	0,88
Δ di-mono2 S_{CS}	0,83	Δ di-mono2 S_{HS}	0,79
Δ di-mono6 S_{CS}	0,61	Δ di-0 S_{HS}	0,84
Δ di-0 S_{HA}	0,49		
Δ di-0 S_{CS}	0,54		

Bei der Bestimmung der *interday*-Präzision mit einer Injektionsmenge von 4 pmol je Standard wurden für die prozentualen Standardabweichungen Werte zwischen 7,53% und 12,65% berechnet (Tab. 3.4).

Tab. 3.4 *Interday*-Präzision der HPLC-Methode für die 16 verschiedenen, mit AMAC derivatisierten Δ -Disaccharid-Standards bei einer Injektionsmenge von je 4 pmol. Es erfolgte jeweils eine Messung an 10 aufeinander folgenden Tagen. Angegeben ist der Variationskoeffizient (VK).

<i>Interday</i> -Präzision			
HA, CS und DS		HS und H	
Δ -Disaccharid	VK [%]	Δ -Disaccharid	VK [%]
Δ di-tri(2,4,6) S_{CS}	9,63	Δ di-tri(2,6,N) S_{HS}	12,4
Δ di-di(2,4) S_{CS}	8,80	Δ di-di(6,N) S_{HS}	11,7
Δ di-di(4,6) S_{CS}	12,7	Δ di-di(2,N) S_{HS}	10,0
Δ di-di(2,6) S_{CS}	10,2	Δ di-di(2,6) S_{HS}	9,42
Δ di-mono4 S_{CS}	8,60	Δ di-mono6 S_{HS}	9,87
Δ di-mono2 S_{CS}	9,03	Δ di-mono2 S_{HS}	11,7
Δ di-mono6 S_{CS}	8,23	Δ di-0 S_{HS}	10,9
Δ di-0 S_{HA}	7,53		
Δ di-0 S_{CS}	7,64		

Die Nachweisgrenze (NWG) trifft eine Aussage über den Messwert, welcher gerade noch zuverlässig nachgewiesen, nicht jedoch genau quantitativ bestimmt werden kann. Messwerte unterhalb der Nachweisgrenze werden als nicht nachweisbar eingestuft. Als Kriterium für einen zuverlässigen Nachweis wird in der Regel die Präzision des Messverfahrens bei einer Blind- bzw. Leermessung herangezogen. Eine gebräuchliche Definition der Nachweisgrenze (NWG) basiert auf der Standardabweichung des Blindwertes s_B und dem Mittelwert des Blindwertes y_B von 5 aufeinanderfolgenden Messungen [87]:

$$NWG = y_B + 3 \cdot s_B$$

Der Blindwert wurde nach der Injektion des Probenlösungsmittels (ohne Probe) zum passenden Retentionszeitpunkt des jeweiligen Standards ermittelt.

Die Quantifizierungsgrenze (QG) ist die kleinste Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einer festgelegten Präzision bestimmt werden kann. Erst oberhalb der Quantifizierungsgrenze werden quantitative Analyseergebnisse angegeben.

Wie bei der Nachweisgrenze wird die gewünschte Genauigkeit auf die Präzision des Blindwertes bezogen [87]:

$$\text{Quantifizierungsgrenze} = y_B + 9 \cdot s_B$$

Tab. 3.5 Nachweisgrenze (NWG) und Quantifizierungsgrenze (QG) der Methode für die 16 Δ -Disaccharid-Standards.

HA, CS und DS			HS und H		
Δ -Disaccharid	NWG [fmol]	QG [fmol]	Δ -Disaccharid	NWG [fmol]	QG [fmol]
Δ di-tri(2,4,6) S_{CS}	100	150	Δ di-tri(2,6,N) S_{HS}	60	110
Δ di-di(2,4) S_{CS}	10	20	Δ di-di(6,N) S_{HS}	60	120
Δ di-di(4,6) S_{CS}	20	30	Δ di-di(2,N) S_{HS}	70	150
Δ di-di(2,6) S_{CS}	10	20	Δ di-di(2,6) S_{HS}	30	40
Δ di-mono4 S_{CS}	60	90	Δ di-mono6 S_{HS}	40	70
Δ di-mono2 S_{CS}	20	40	Δ di-mono2 S_{HS}	30	50
Δ di-mono6 S_{CS}	10	30	Δ di-0 S_{HS}	20	30
Δ di-0 S_{HA}	40	90			
Δ di-0 S_{CS}	20	50			

3.1.3 Aufreinigung von Glykosaminoglykanen aus biologischen Proben

Den ersten Schritt zur Analytik von Glykosaminoglykanen stellt die Aufreinigung aus biologischen Proben dar. In Abhängigkeit von dem Probenmaterial und der eingesetzten analytischen Methode werden in der Literatur eine Vielzahl von Aufreinigungsprotokollen beschrieben, welche sich in der Regel aus einer individuellen Kombination von grundlegenden Aufreinigungsschritten zusammensetzen. Zielsetzung ist ein Aufreinigungsprotokoll gewesen, welches Glykosaminoglykane aus biologischen Proben jeder Art aufschließen kann und einen möglichst geringen Verlust an Glykosaminoglykanen bei der Aufreinigung aufweist. Dazu wurden die einzelnen Aufreinigungsschritte jeder Stufe bezüglich ihrer Effektivität miteinander verglichen.

Den ersten Schritt stellt der Aufschluss der biologischen Probe unter Freisetzung der Glykosaminoglykan-Ketten vom Proteoglykan dar. Dabei wird meistens ein enzymatischer Aufschluss der Probe mit Enzymen wie Papain, Pronase oder Proteinase K durchgeführt. Für

die Extraktion von GAGs aus flüssigen Proben wie z.B. Urin führt der enzymatische Aufschluss zu vollständigen Freisetzung der GAG-Ketten. Bei festen Proben oder stark proteinhaltigen Proben war jedoch ein größerer Aufwand notwendig, um die Glykosaminoglykane vollständig freizusetzen. Hierzu zählt das Zerkleinern von Proben, der Zusatz von Detergenzien und die wiederholte Zugabe von Proteasen mit Verdauzeiten von mehreren Tagen. Eine andere Möglichkeit zur Freisetzung der Glykosaminoglykane besteht in der Zugabe einer alkalischen Natriumborhydridlösung zur Probe [88]. Durch Zugabe einer 1 M alkalischen Natriumborhydridlösung konnten alle Arten von Proben bei 37 °C über Nacht ohne Vorbehandlung oder Schütteln gelöst und die Glykosaminoglykane freigesetzt werden. Die Nachteile der Natriumborhydridlösung bestehen in ihrer Giftigkeit und Reaktivität. Bezogen auf die quantitative Freisetzung der Glykosaminoglykane aus allen Arten von Proben, ist der Einsatz einer Natriumborhydridlösung dem enzymatischen Verdau überlegen.

Der zweite Schritt des Aufreinigungsprotokolles besteht in der Denaturierung und Fällung der Proteine, wobei die Glykosaminoglykane im Überstand bleiben. Neben der seltener eingesetzten Hitzedenaturierung ist die hocheffektive TCA-Fällung bei einer Konzentration von 5-10% TCA unter Eiskühlung eine Standardmethode. Bei einigen Proben war es notwendig die TCA-Konzentration auf 12% zu erhöhen, um alle Verunreinigungen mittels anschließender Zentrifugation zu sedimentieren. Ohne die TCA-Fällung verblieben Verunreinigungen in der Probe, welche die nachfolgende Aufreinigung und Derivatisierung störten. Dadurch kam es zu einer Störung der Basislinie im Chromatogramm und/oder falsch erniedrigten *Peaks* für die zu analysierenden Δ -Disaccharide. Ohne TCA-Fällung ergab sich für eine aufgereinigte Thrombozytenprobe ein falsch erniedrigter *Peak* bzw. Wert für Δ di-mono4S_{CS} (Abb. 3.4).

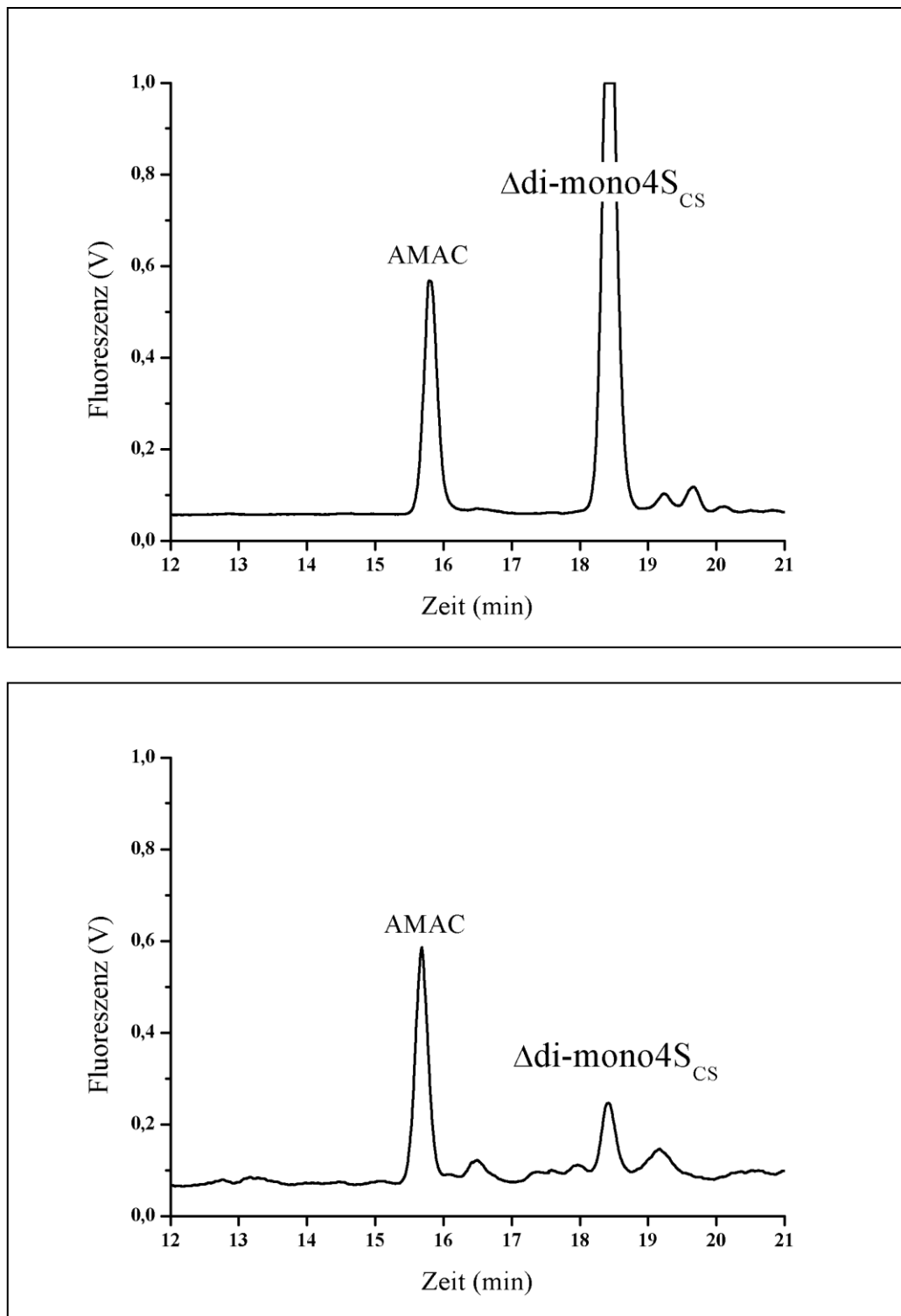
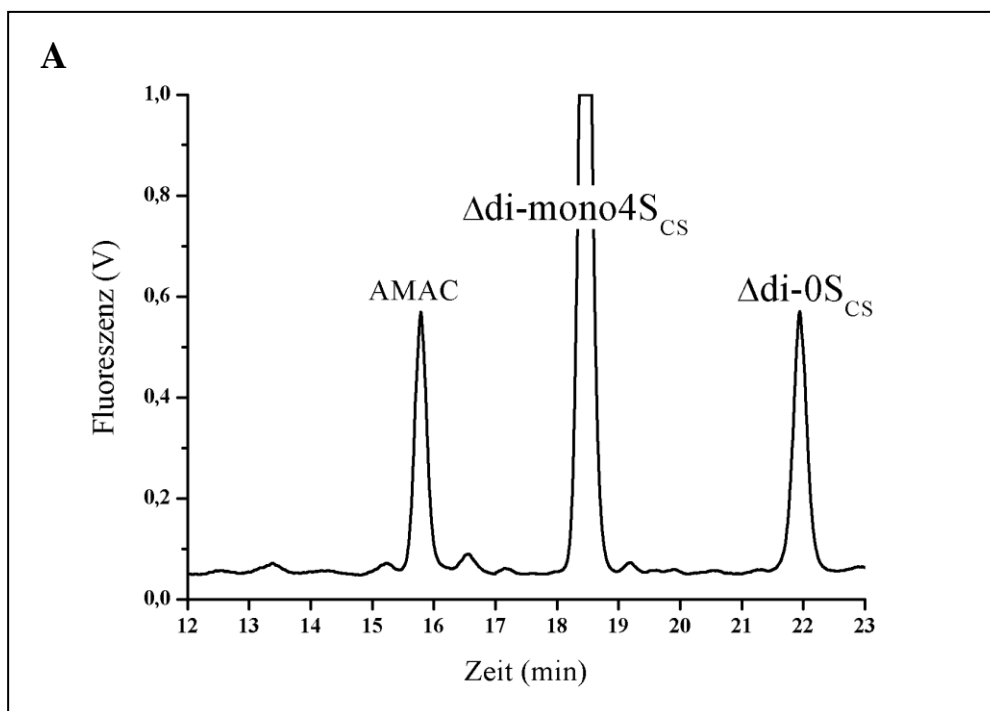


Abb. 3.4 Vergleich des Aufreinigungsprotokolles mit TCA-Fällung (oberes Bild) im Vergleich zum Aufreinigungsprotokoll ohne TCA-Fällung (unteres Bild).

Eine weiterer Schritt für die Aufreinigung ist die Anionenaustauschchromatographie. Dabei binden die negativ geladenen Glykosaminoglykane an die positiv geladene Säulenoberfläche und alle Verunreinigungen passieren die Säule beim Waschen. Beim Einsatz einer

Diethylaminoethyl(DEAE)-matrix sowohl in Form von *Beads* als auch Einmalsäulen ergab sich allerdings eine deutliche Schwankung für die Wiederfindung für das nicht sulfatierte Chondroitin-0-Sulfat, so dass dieser Schritt keine weitere Anwendung fand.

Damit letztendlich der enzymatische Verdau und die Derivatisierung quantitativ erfolgen konnten, musste die Probe zuvor entsalzt werden. Bei nicht entsalzten Proben war eine deutliche Verminderung der *Peak*-Fläche des Δ -Disaccharides im Vergleich zu entsalzten Proben zu beobachten (Abb. 3.5). Dabei wurde eine Thrombozytenkonzentratprobe parallel einmal mit und einmal ohne Ultrafiltration aufgereinigt. Alle vorhergehenden Aufreinigungsschritte waren gleich. Die Entsalzung erfolgte mit 0,5 ml fassenden Polyethersulfon-Ultrafiltern, wodurch eine Entsalzung mit nahezu quantitativer Rückentnahme der Glykosaminoglykane aus dem Retentat möglich war. Somit fand keine Bindung der Glykosaminoglykane an die Membran des Ultrafilters statt und die gewählte Porengröße von 3 kDa war ausreichend klein, um für die Glykosaminoglykan-Ketten nicht passierbar zu sein.



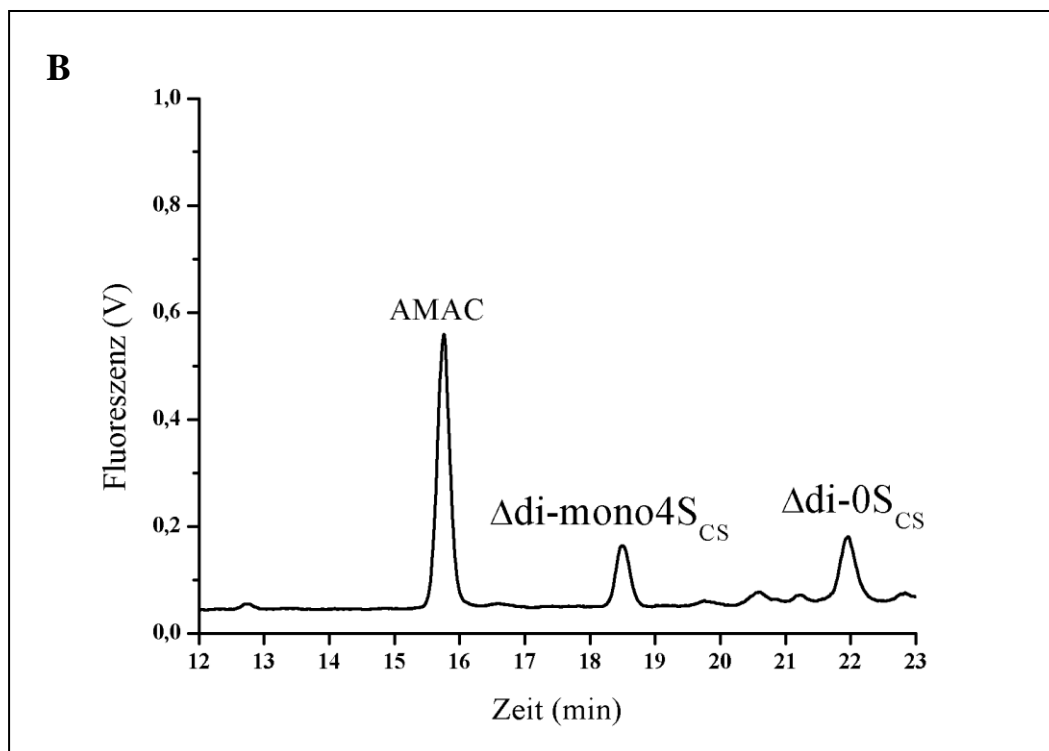


Abb. 3.5 Aufreinigung einer biologischen Probe (Thrombozytenkonzentrat) mit Ultrafiltration (Abbildung A) und ohne Ultrafiltration (Abbildung B) als Bestandteil des Aufreinigungsprotokolles.

Abschließend wurde die Wiederfindungsrate für das Gesamtprotokoll bestimmt. Hierfür war keine Glykosaminoglykan-Standardlösung in biologischer Matrix erhältlich. Deshalb wurden für die Bestimmung eine Lösung von Chondroitin-4-Sulfat (CS-A, Sigma) und Blutspenderserum eingesetzt.

Tab. 3.6 Doppelansätze zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Chondroitin-4-Sulfat in der biologischen Matrix von Serum bei drei verschiedenen Konzentrationen.

	1. Chondroitin-4-Sulfat- Lösung	2. Serumprobe	3. Chondroitin-4-Sulfat- Lösung + Serumprobe
Konzentration von $\Delta\text{di-mono4S}_{\text{CS}}$	200 pmol	200 pmol	200 pmol + 200 pmol
	400 pmol	400 pmol	400 pmol + 400 pmol
	2000 pmol	2000 pmol	2000 pmol + 2000 pmol

Die Proben 2 und 3 wurden dem Aufreinigungsprotokoll unterzogen, während die Probe 1 als Referenz nur entsalzt wurde. Zur Bestimmung der Wiederfindung von Chondroitin-4-Sulfat

in der, durch die Serumprobe gegebenen, biologischen Matrix wurde der Messwert für Δ di-mono4S_{CS} der Probe 2 von dem Wert für Δ di-mono4S_{CS} der Probe 3 subtrahiert. Das Ergebnis wurde dann mit dem Messergebnis der Probe 1 verglichen. Je mehr Glykosaminoglykane bei der Aufreinigung der Probe 3 verloren gingen, desto geringer fiel die prozentuale Wiederfindungsrate im Vergleich zur Referenzprobe 1 aus, deren Messwert die Ausgangskonzentration von Chondroitin-4-Sulfat bzw. Δ di-mono4S_{CS} angab. Für die 3 verschiedenen Konzentrationsbereiche ergaben sich folgende Wiederfindungsraten aus den Mittelwerten der Doppelbestimmungen:

Tab. 3.7 Wiederfindungsrate für Chondroitin-4-Sulfat in biologischer Matrix (Serum) bei 3 verschiedenen Ausgangskonzentrationen.

Ausgangskonzentration für Δ di-mono4S _{CS}	Wiederfindungsrate für Chondroitin-4-Sulfat
200 pmol	101,0%
400 pmol	97,3%
2000 pmol	97,4%

3.2 Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Blutzellen

3.2.1 Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Erythrozyten

Erythrozytenproben wurden von 6 verschiedenen Erythrozytenkonzentraten entnommen. Je $3,5 \cdot 10^9$ Erythrozyten wurden je Probe für die Glykosaminoglykan-Analytik eingesetzt. Es konnten keine Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide nachgewiesen werden, so dass die jeweiligen Konzentrationen in den Proben unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Methode lagen (Abb. 3.6).

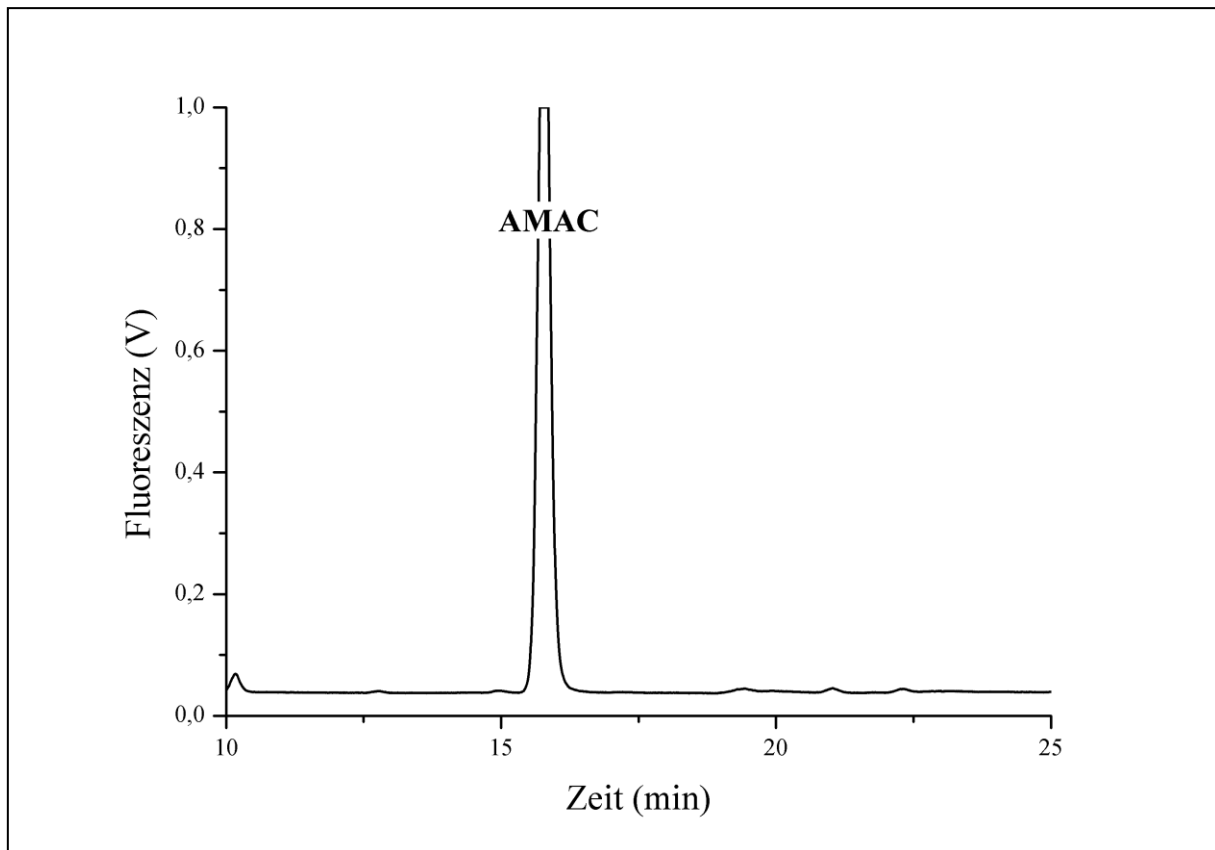


Abb. 3.6 Chromatogramm der HPLC-Analyse von Glykosaminoglykan Δ -Disacchariden in Erythrozyten. Es wurden keine *Peaks* zu den untersuchten Δ -Disacchariden gefunden.

3.2.2 Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Thrombozyten

Zur Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Thrombozyten wurden frische Blutproben von 20 weiblichen (41 ± 9 Jahre alt, Mittelwert \pm SEM) und 15 männlichen (47 ± 9 Jahre alt, Mittelwert \pm SEM) Blutspendern eingesetzt. Ausgehend von 15 ml EDTA-Blut erfolgte eine Aufreinigung in zwei Zentrifugationsschritten, in denen die geringe Dichte der

Thrombozyten im Vergleich zu den anderen Blutzellen zur Trennung genutzt wurde. Dabei befinden sich die Thrombozyten nach einer Zentrifugation immer oberhalb der restlichen Blutzellen. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wurde in der oberen Phase das plättchenreiche Plasma entnommen. Bei der zweiten Zentrifugation wurde mittels eines Dichtegradientenmediums ein Stufengradient hergestellt, der zu einer nahezu quantitativen Abtrennung aller unerwünschten Zellen aus dem plättchenreichen Plasma führte. Bei den abschließenden Waschschritten mussten die Zentrifugationsschritte bezogen auf die Zentrifugalkraft so abgestimmt werden, dass die Thrombozyten nicht am Gefäßboden miteinander verklumpten und gleichzeitig noch möglichst quantitativ pelletiert wurden. Für den ersten Waschriff wurde eine höhere Zentrifugationsgeschwindigkeit als für den Zweiten gewählt, da sich die Thrombozyten beim ersten Waschriff noch in einer verdünnten Percolllösung befanden.

Bezogen auf die Ausgangskonzentration wurden bei den 35 Proben durchschnittlich $1,0 \cdot 10^9 \pm 390 \cdot 10^6$ Thrombozyten (Mittelwert \pm SEM) aufgereinigt. Damit ergab sich eine Wiederfindungsrate von $31\% \pm 10\%$ (Mittelwert \pm SEM) und eine hohe Reinheit, da im Durchschnitt 99,4% der Ausgangsleukozyten entfernt worden waren. Folgende Δ -Disaccharide wurden mit der HPLC-Analytik nachgewiesen (Tab. 3.8)

Tab. 3.8 Mittelwerte der Δ -Disaccharidkonzentrationen von 35 Thrombozytenproben.

Δ -Disaccharide	Δ -Disaccharidkonzentration in pmol/ 10^6 Thrombozyten (Mittelwert \pm SEM)
Δ di-mono4S _{CS}	$11 \pm 3,4$
Δ di-mono6S _{CS}	$0,048 \pm 0,048$
Δ di-0S _{CS}	$0,14 \pm 0,11$
Δ di-0S _{HA}	$0,45 \pm 0,36$

Für die anderen untersuchten Δ -Disaccharide lag die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze der Methode.

Für die Gesamtkonzentration der Δ -Disaccharide wurde ein Wert von $12 \pm 3,6$ pmol/ 10^6 Thrombozyten (Mittelwert \pm SEM) berechnet. Es ergaben sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Δ -Disaccharidkonzentrationen. Das Δ -Disaccharid Δ di-mono4S_{CS} ist mit

einem Anteil von 94,5% die Hauptkomponente der Glykosaminoglykane in Thrombozyten (Abb. 3.7).

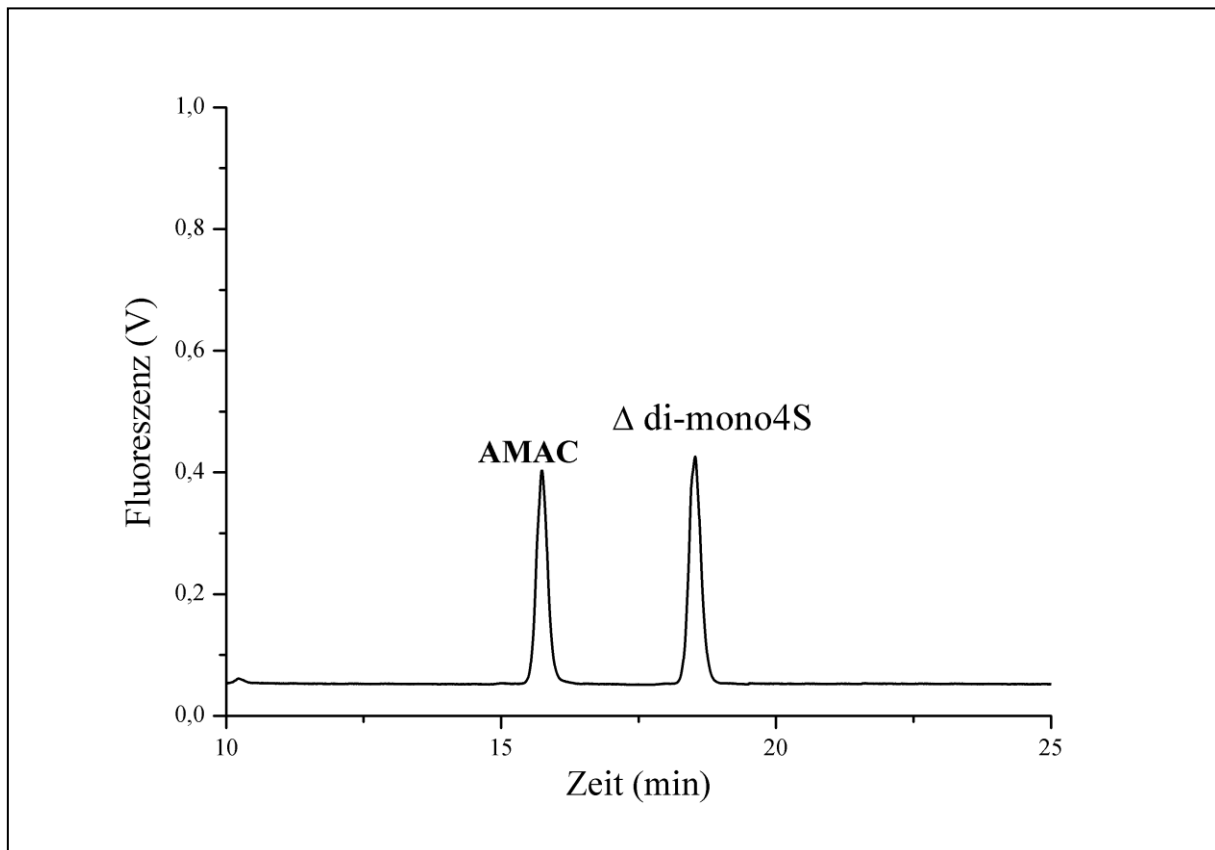


Abb. 3.7 Analyse der Δ -Disaccharide in Thrombozyten. Dargestellt ist ein typisches Chromatogramm zur Quantifizierung des Δ -Disaccharides Δ di-mono4S_{CS}.

3.2.3 Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Granulozyten

Die Isolierung von Granulozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation stellte hohe Anforderungen an die Isolierungsmethode, da Blutzellen sowohl mit geringerer als auch höherer Dichte als Granulozyten abzutrennen waren. Weiterhin gibt es zwischen den Kurven der Dichteverteilung von Erythrozyten und Granulozyten einen kleinen Überlappungsbereich. Die theoretisch einfachste Möglichkeit wäre eine Isolierung der Granulozyten in einem Schritt mit zwei Dichtegradientenschichten gewesen, zwischen denen sich die Granulozyten nach der Zentrifugation gesammelt hätten (Abb. 3.8).

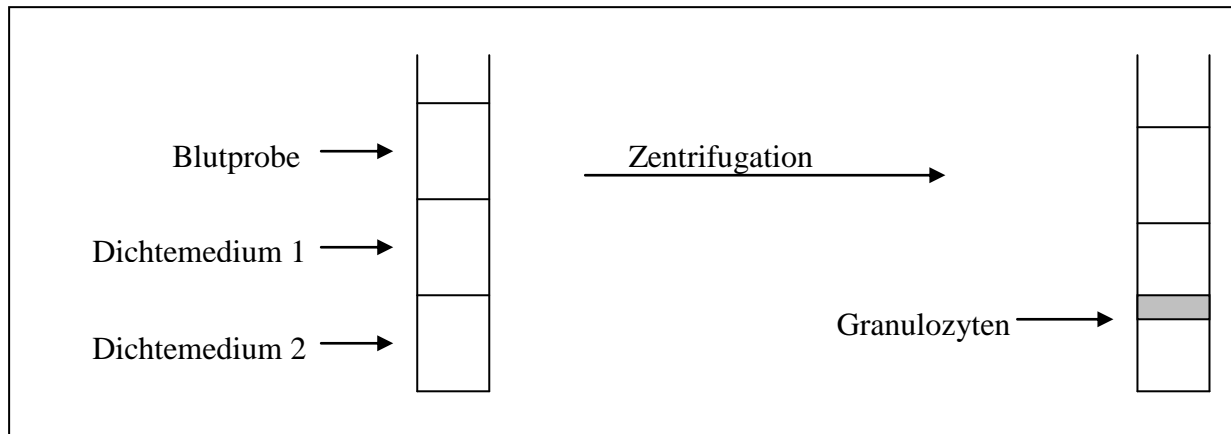


Abb. 3.8 Schematische Darstellung der Isolierung von Blutzellen (hier Granulozyten) aus Vollblut in einem Zentrifugationsschritt mit zwei Dichtemedien.

Dabei kam es jedoch stets zu leichten Vermischungen der Phasen und letztendlich zur einer erhöhten Kontamination der Granulozyten mit anderen Blutzellen. Deshalb wurden zwei Zentrifugationsschritte mit dem Einsatz von je einem Dichtemedium gewählt. In dem ersten Zentrifugationsschritt wurden zunächst die Erythrozyten von der Blutprobe abgetrennt. Dazu wurde eine Verdünnung des Dichtemediums Percoll eingesetzt. Zur Einstellung der passenden Osmolarität wurde die Lösung einmal mit Natriumchlorid und zum Vergleich mit Saccharose eingestellt. Bei Einstellung des Dichtemediums mit Natriumchlorid ergab sich eine bessere Abtrennung der Erythrozyten im Vergleich zur Einstellung der Osmolarität mit Saccharose, so dass nachfolgend eine 1,5 M NaCl-Lösung genutzt wurde. Im zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Dichtegradientenmedium Ficoll zur Abtrennung aller Zellen mit einer geringeren Dichte als Granulozyten genutzt. Die kommerziell erhältliche Ficolllösung hatte die passende Dichte für den Trennschritt und musste daher nicht modifiziert werden.

In weiteren Versuchen zeigte sich, dass die Abtrennung der Erythrozyten als erster Schritt und die Abtrennung der Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten im zweiten Zentrifugationsschritt zu den höchsten Ausbeuten und Reinheiten führte. Bei 15% der Proben kam es zu Kontaminationen mit Erythrozyten, so dass nach den beiden Zentrifugationsschritten noch eine Zelllyse der Erythrozyten in destilliertem Wasser durchgeführt werden musste. Eine vergleichbare Lyse der Erythrozyten mit 0,85%iger, kalter Ammoniumchloridlösung für 10 min im Dunkeln führte zu einer unzureichenden Lyse und Entfernung der Erythrozyten.

Zur Analyse der Glykosaminoglykane wurden Blutproben von 32 weiblichen (Alter: 37 ± 7 Jahre, Mittelwert \pm SEM) und 24 männlichen Blutspendern (Alter: 39 ± 6 Jahre, Mittelwert \pm SEM) eingesetzt. Ausgehend von 15 ml EDTA-Blut ergab sich für die Granulozyten nach der Aufreinigung mit Bezug auf die Anfangskonzentration in Vollblut eine Wiederfindungsrate von $43\% \pm 9\%$ (Mittelwert \pm SEM). Dabei wurden $21,9 \cdot 10^6 \pm 8,10 \cdot 10^6$ (Mittelwert \pm SEM) Granulozyten aufgereinigt. Es wurde eine hohe Reinheit mit einem Anteil der Granulozyten von $98,3\% \pm 0,86\%$ (Mittelwert \pm SEM) in den Proben erzielt. Die ermittelte Reinheit bezieht sich, ausgehend von den gemessenen Zellzahlen, auf die Kontamination mit bzw. den Anteil von anderen Leukozyten. Folgende Δ -Disaccharide wurden mit der HPLC-Analytik nachgewiesen (Tab. 3.9).

Tab. 3.9 Mittelwerte der Δ -Disaccharidkonzentrationen von 56 Granulozytenproben.

Δ -Disaccharide	Δ -Disaccharidkonzentration in pmol/ 10^6 Granulozyten (Mittelwert \pm Mittelabweichung)
Δ di-di(2,6) S_{CS}	$4,9 \pm 4,3$
Δ di-mono4 S_{CS}	140 ± 70
Δ di-mono6 S_{CS}	24 ± 27
Δ di-0 S_{HA}	150 ± 172

Für die anderen untersuchten Δ -Disaccharide lag die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze der Methode. Die Δ -Disaccharide Δ di-mono4 S_{CS} und Δ di-0 S_{HA} bilden mit einem Anteil von 90,9% die Hauptkomponenten der Glykosaminoglykane in Granulozyten (Abb. 3.9). Für die Gesamtkonzentration der Δ -Disaccharide wurde ein Wert von 316 ± 192 pmol/ 10^6 Granulozyten (Mittelwert \pm SEM) berechnet. Die Gesamtkonzentration der Δ -Disaccharide war bei den weiblichen Blutspendern mit 386 ± 164 pmol/ 10^6 Granulozyten (Mittelwert \pm SEM) höher als bei den männlichen Blutspendern mit 229 ± 139 pmol/ 10^6 Granulozyten (Mittelwert \pm SEM).

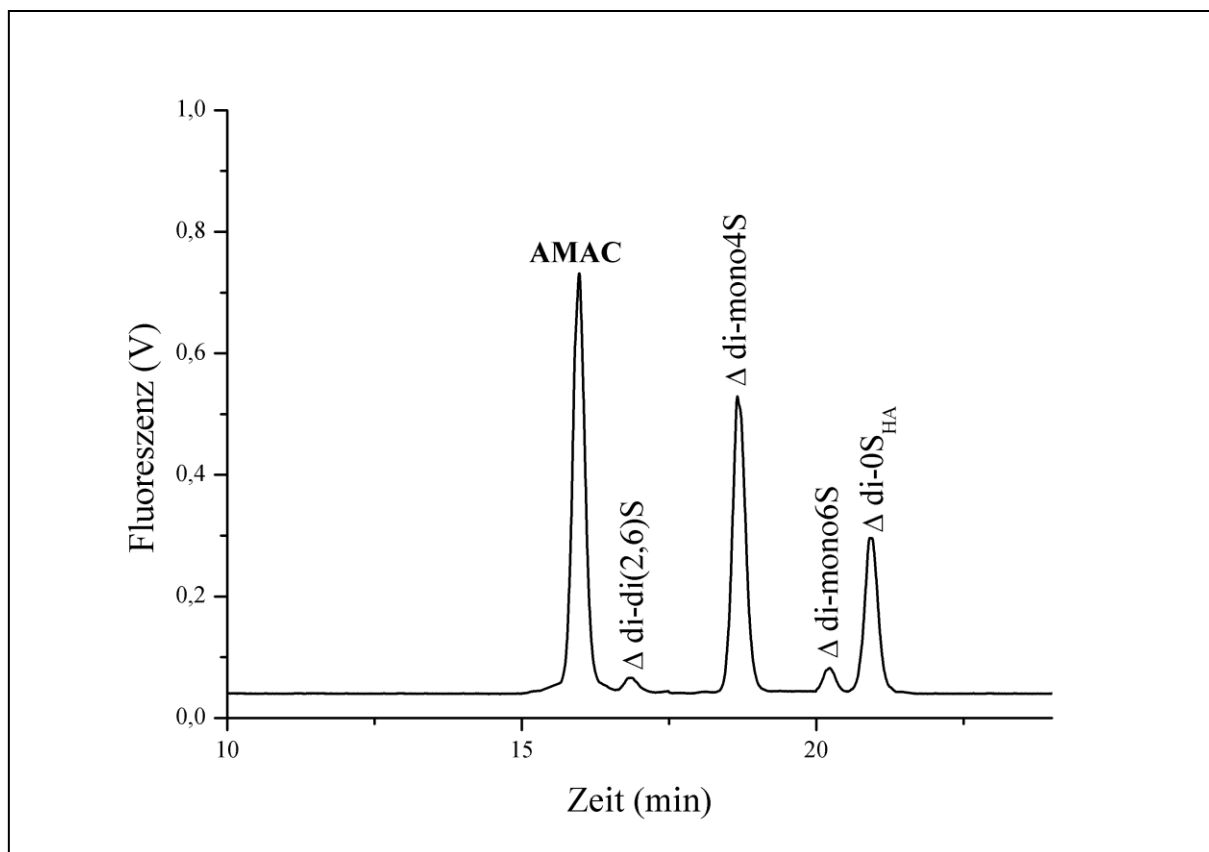


Abb. 3.9 Analyse der Δ -Disaccharide von Granulozyten mittels RP-HPLC.

3.3 Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von humanen Zellkulturlinien

Insgesamt wurden 22 verschiedene humane Zelllinien auf die Zusammensetzung ihrer Glykosaminoglykane untersucht. Damit erfolgte die Erstcharakterisierung der Zusammensetzung der Glykosaminoglykane bei diesen Zelllinien. Zusätzlich sollte aufgezeigt werden, ob sich signifikante Unterschiede in der Menge und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane zwischen den untersuchten Suspensionszelllinien und adhärennten Zelllinien sowie zwischen verschiedenen Gruppen von adhärennten Zelllinien ergeben würden.

3.3.1 Bestimmung der Gesamtmenge der Glykosaminoglykane in humanen Zelllinien

Um eine für die Analytik ausreichende Zellzahl zu erreichen, wurden je Zelllinie zwei 175 cm² Zellkulturflaschen geerntet. Nach der Bestimmung der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide mittels RP-HPLC ergaben sich folgende Ergebnisse für die untersuchten Zelllinien (Tab. 3.10):

Tab. 3.10 Summen aus den Werten der HPLC-Messung zu den einzelnen Δ -Disacchariden für jede der untersuchten Zelllinien.

Zelllinie	Δ -Disaccharide pmol/10 ⁶ Zellen
1301	21,37
A-431	131,89
A-549	82,79
BM-1604	28,67
CAPAN-1	76,48
CAPAN-2	47,95
Chang Liver	121,80
EA.hy926	90,73
HEK-293	72,67
Hs27	424,90
HT-1080	75,47
HT-29	100,12
hTERT-BJ1	111,69
K-562	16,63
LNCAP	42,50
MHH-ES-1	43,08

Zelllinie	Δ -Disaccharide pmol/ 10^6 Zellen
SAOS-2	298,63
SW 1353	152,18
SW 982	92,72
THP-1	12,44
WERI-RB-1	14,98
Y-79	11,71

Die Gesamtmenge an Glykosaminoglykan Δ -Disacchariden war in den 5 Suspensionszelllinien 1301, K-562, THP, WERI-RB-1 und Y-79 mit einem Wert von 19 ± 7 pmol/ 10^6 Zellen (Mittelwert \pm SEM) im Vergleich zu den 17 adhären Zelllinien mit einem Wert von 116 ± 57 pmol/ 10^6 Zellen (Mittelwert \pm SEM) signifikant erniedrigt ($p = 0,03$) (Abb. 3.10 u. 3.11).

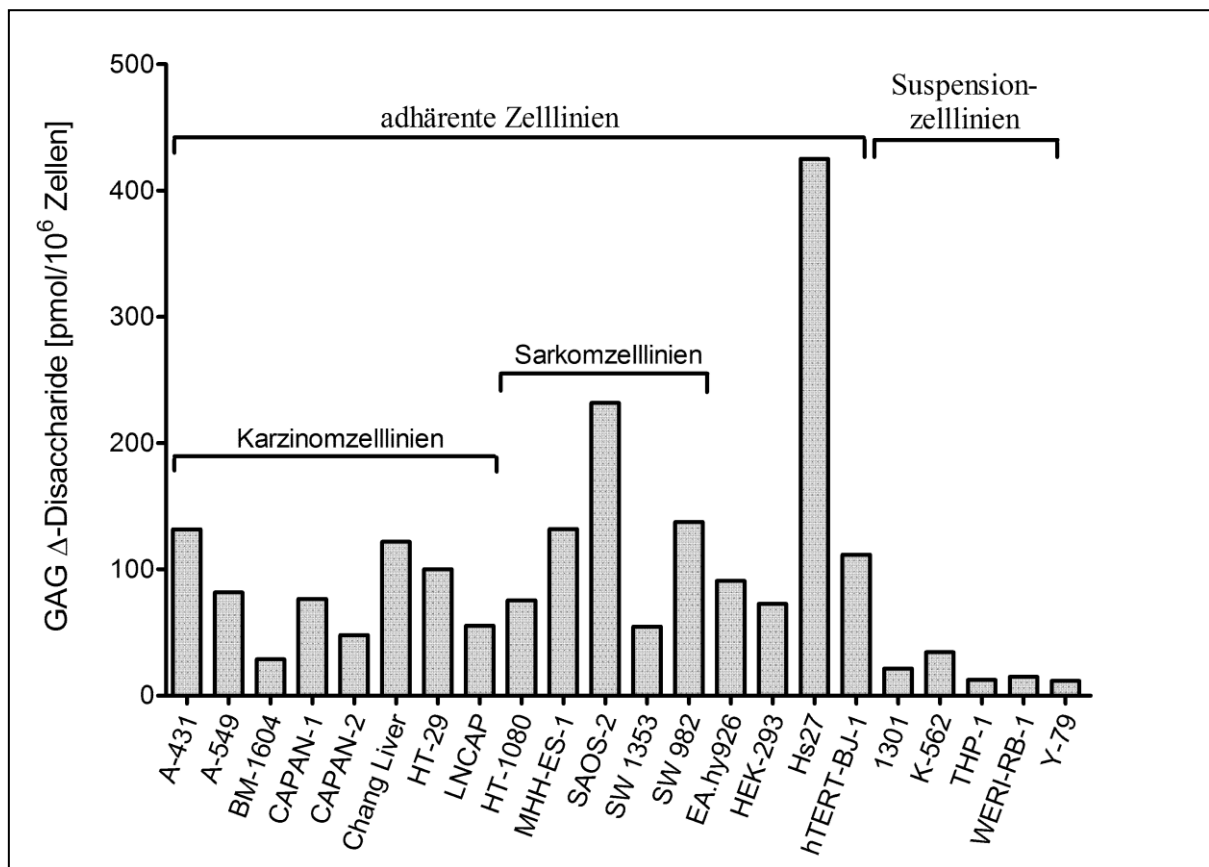


Abb. 3.10 Darstellung der Gesamtkonzentration von Δ -Disacchariden in verschiedenen Zelllinien.

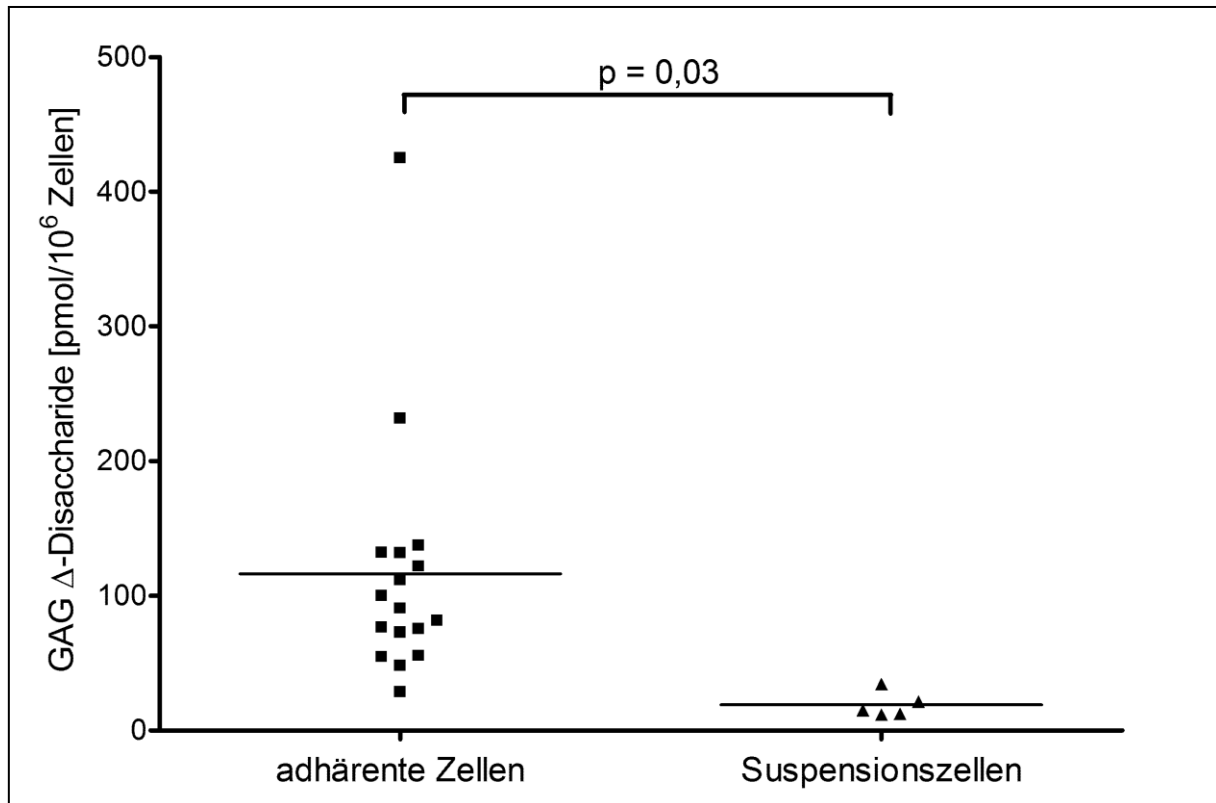


Abb. 3.11 Darstellung des Vergleiches der Gesamtkonzentration von Glykosaminoglykan Δ -Disacchariden in adhärenenten Zellen und Suspensionszellen. Die schwarzen Balken repräsentieren den Mittelwert.

Die Werte für die Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide der Gruppen 1, 2 und 3, bzw. HA, CS, DS, HS und H waren in den Suspensionszellen vermindert. Allerdings zeigte sich der stärkste und einzigst für sich allein signifikante Unterschied ($p = 0,037$) bei HS/H mit einem Ergebnis von 6 ± 5 pmol/10⁶ Zellen (Mittelwert \pm SEM) für die Suspensionszelllinien im Vergleich zu den adhärenenten Zelllinien mit 69 ± 40 pmol/10⁶ Zellen (Mittelwert \pm SEM). Beim Vergleich der 8 untersuchten Karzinomzelllinien (Epithelzellen) mit den 5 Sarkomzelllinien (mesenchymale Zellen) zeigten sich keine mit den unterschiedlichen Gewebegrundtypen einhergehenden Unterschiede in der Glykosaminoglykankonzentration.

3.3.2 Analytik der Δ -Disaccharid-Komposition in humanen Zelllinien

Weiterhin wurden die unterschiedlichen Zelllinien bezüglich ihrer Δ -Disaccharid-Zusammensetzung untersucht und miteinander verglichen (Tab. 3.11).

Tab. 3.11 Ergebnisse der RP-HPLC Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide in 22 humanen Zelllinien. Die Konzentration der Δ -Disaccharide ist in pmol/ 10^6 Zellen angegeben. Die 5 Suspensionszelllinien sind in der Tabelle unten aufgeführt.

	HA	CS/DS			HS/H				
Zelllinie	Δ di-0S _{HA}	Δ di-mono2S _{CS}	Δ di-mono4S _{CS}	Δ di-mono6S _{CS}	Δ di-0S _{HS}	Δ di-mono2S _{HS}	Δ di-mono6S _{HS}	Δ di-di(2,N)S _{HS}	Δ di-di(6,N)S _{HS}
A-431	0,00	1,71	6,41	0,40	95,24	8,92	10,11	0,00	9,11
A-549	2,60	2,11	28,26	6,21	30,78	2,44	6,86	0,00	3,53
BM-1604	0,45	1,64	6,36	2,27	15,28	1,03	1,31	0,00	0,34
CAPAN-1	6,10	5,01	13,92	5,60	32,32	5,66	5,12	0,00	2,76
CAPAN-2	0,00	2,71	2,25	3,32	28,23	7,14	2,89	0,26	1,14
Chang Liver	19,03	12,96	28,83	14,35	25,33	1,52	7,98	0,00	11,80
EA.hy926	1,94	6,09	37,45	5,92	34,51	4,83	0,00	0,00	0,00
HEK-293	1,10	2,28	16,13	4,75	29,71	4,56	8,86	0,00	5,28
Hs27	24,57	15,87	87,51	20,96	208,91	38,64	14,74	7,28	6,42
HT-1080	0,00	2,56	10,92	0,00	53,27	6,90	0,00	0,46	1,35
HT-29	0,69	1,98	1,00	1,41	83,22	4,41	4,77	0,80	1,85
hTERT-BJ1	33,73	2,38	15,41	10,48	35,39	7,94	4,49	0,00	1,88
LNCAP	0,00	3,63	8,56	4,11	10,31	0,00	3,81	0,00	12,08
MHH-ES-1	4,46	2,98	2,03	2,41	19,54	2,03	6,42	0,00	3,21
SAOS-2	93,78	12,71	32,38	22,37	112,79	12,41	5,77	0,00	6,41
SW 1353	5,52	8,90	55,17	19,46	46,90	10,06	4,06	0,00	2,12
SW 982	13,31	5,02	21,95	5,69	37,97	7,93	0,00	0,00	0,85
1301	7,24	1,68	9,52	1,80	0,44	0,34	0,00	0,00	0,34
K-562	7,11	2,22	3,37	2,02	1,04	0,30	0,00	0,00	0,58
THP-1	0,00	0,00	11,61	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00	0,14
WERI-RB-1	2,62	1,39	3,72	2,46	1,69	0,00	0,00	0,00	3,10
Y-79	0,00	1,33	3,08	3,50	1,50	0,37	0,00	0,00	1,93

Bei der qualitativen Analyse der Glykosaminoglykane wurden folgende 9 Δ -Disaccharide gefunden: Δ di-0S_{HA} von HA, Δ di-mono2S_{CS}, Δ di-mono4S_{CS} und Δ di-mono6S_{CS} von CS und DS sowie Δ di-0S_{HS}, Δ di-mono2S_{HS}, Δ di-mono6S_{HS}, Δ di-di(2,N)S_{HS} und Δ di-di(6,N)S_{HS} von HS und H. Die Werte für die Δ -Disaccharide Δ di-di(2,6)S_{CS}, Δ di-di(4,6)S_{CS}, Δ di-di(2,4)S_{CS} und Δ di-tri(2,4,6)S_{CS} von CS/DS sowie Δ di-di(2,6)S_{HS} und Δ di-tri(2,6,N)S_{HS} von HS und H lagen bei allen gemessenen Proben unterhalb der Nachweisgrenze der Methode.

Für die Konzentration von Δ di-0S_{HA} konnten keine Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen von Zelllinien festgestellt werden. Weiterhin ergaben sich auch keine klaren Unterschiede im prozentualen Anteil der drei CS/DS Δ -Disaccharide mit Bezug auf die Zusammensetzung von CS und DS beim Vergleich der untersuchten Suspensionszelllinien mit den adhären Zelllinien oder beim Vergleich der Karzinomzelllinien mit den Sarkomzelllinien (Abb. 3.12).

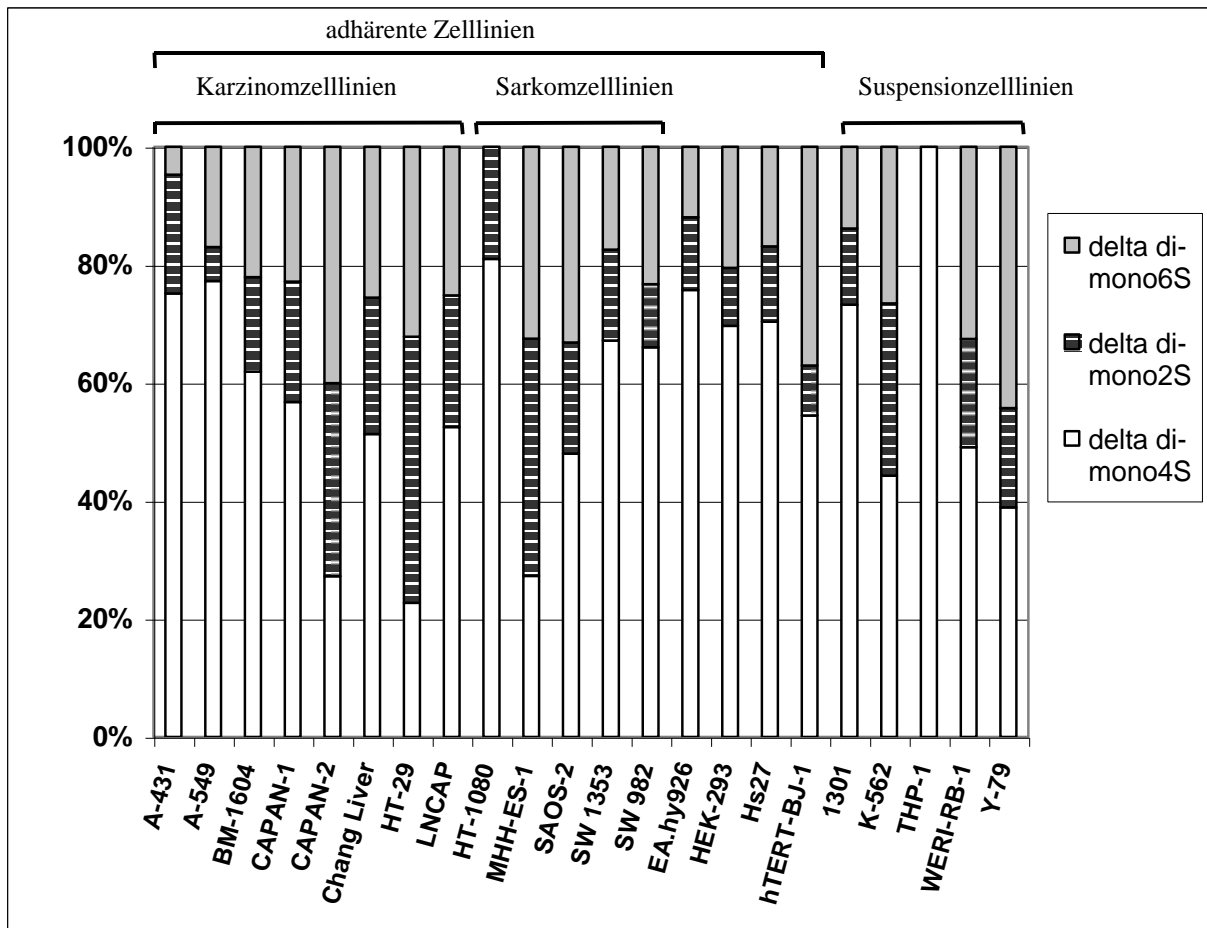


Abb. 3.12 Prozentualer Anteil der verschiedenen CS/DS Δ -Disaccharide mit Bezug auf die Zusammensetzung von CS und DS.

Für den jeweiligen prozentualen Anteil der 5 analysierten HS/H Δ -Disaccharide mit Bezug auf die Gesamtzusammensetzung von HS/H (Abb. 3.13), zeigten sich signifikante Unterschiede für zwei Δ -Disaccharide im Vergleich von adhärennten Zellen mit Suspensionszellen (Abb. 3.14 und 3.15).

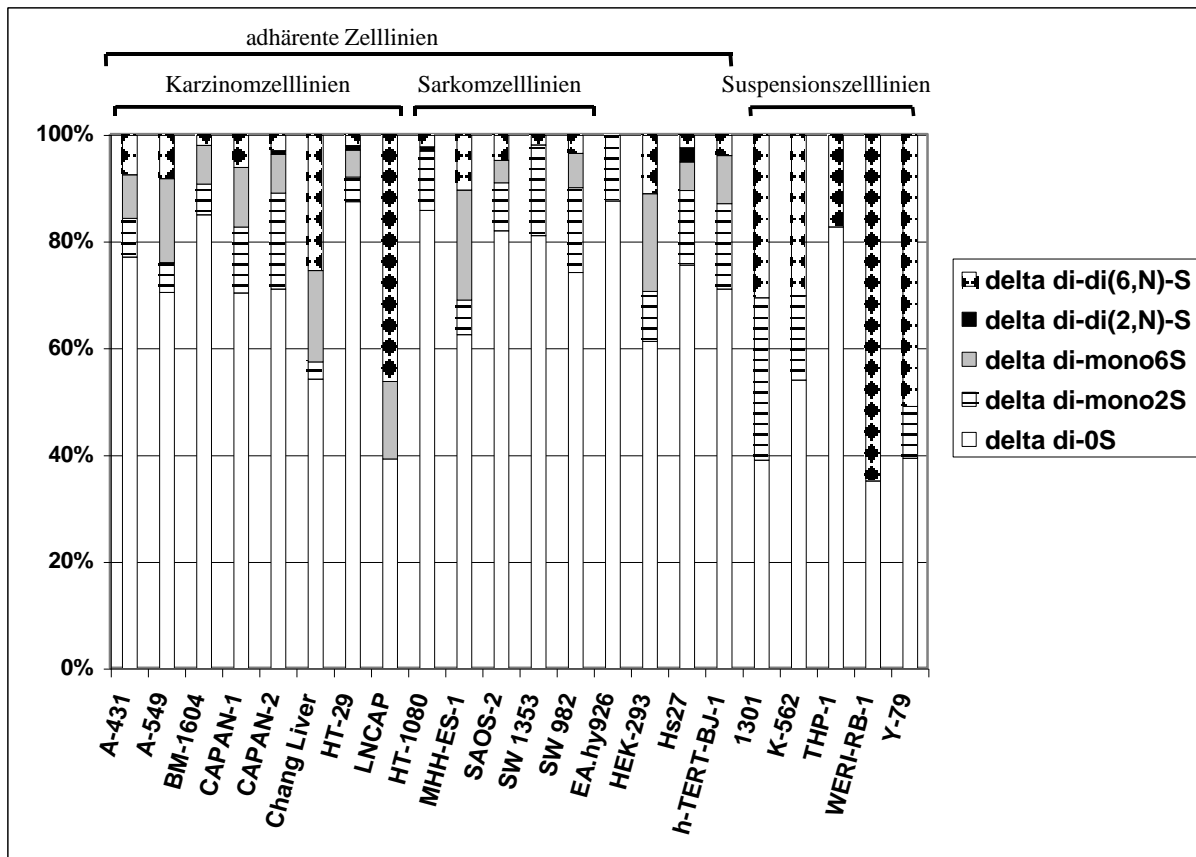


Abb. 3.13 Prozentualer Anteil der verschiedenen HS/H Δ -Disaccharide mit Bezug auf die Zusammensetzung von HS/H.

Der prozentuale Anteil von Δ di-0S_{HS} war bei den untersuchten Suspensionszelllinien mit $50\% \pm 15\%$ (Mittelwert \pm SEM) im Vergleich zum Anteil bei den adhärenen Zelllinien mit $73\% \pm 10\%$ (Mittelwert \pm SEM) signifikant erniedrigt ($p = 0,006$) (Abb. 3.14). Zusätzlich war der prozentuale Anteil von Δ di-di(6,N)_{HS} bei Suspensionszelllinien mit $39\% \pm 15\%$ (Mittelwert \pm SEM) im Vergleich zum Anteil bei den adhärenen Zelllinien mit $8\% \pm 7\%$ (Mittelwert \pm SEM) signifikant erhöht ($p = 0,0002$) (Abb. 3.15). Die Δ -Disaccharide Δ di-mono6S_{HS} und Δ di-di(2,N)_{HS} wurden in keiner der Suspensionszelllinien gefunden. Dahingegen wurde Δ di-mono6S_{HS} in 14 und Δ di-di(2,N)_{HS} in 4 der insgesamt 17 untersuchten adhärenen Zelllinien nachgewiesen.

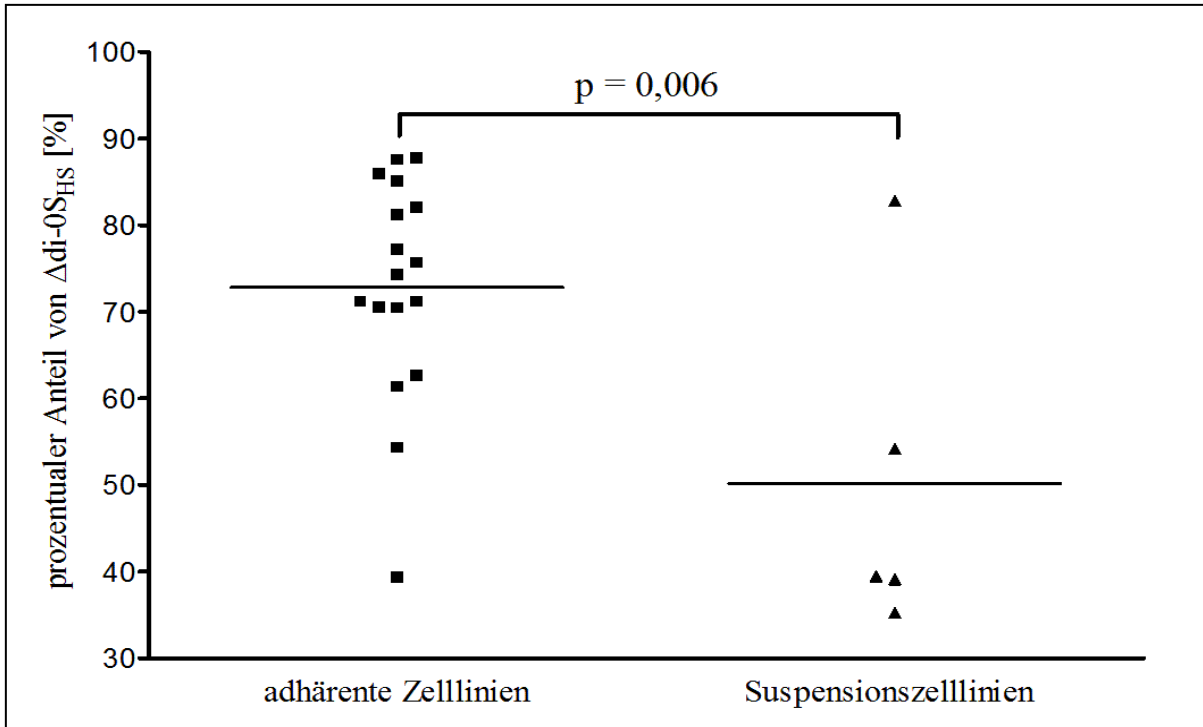


Abb. 3.14 Prozentualer Anteil von Δ di-monoO_{HS} mit Bezug auf die Zusammensetzung von HS/H im Vergleich zwischen den untersuchten adhärenen Zelllinien und Suspensionszelllinien. Die schwarzen Querlinien repräsentieren den jeweiligen Mittelwert.

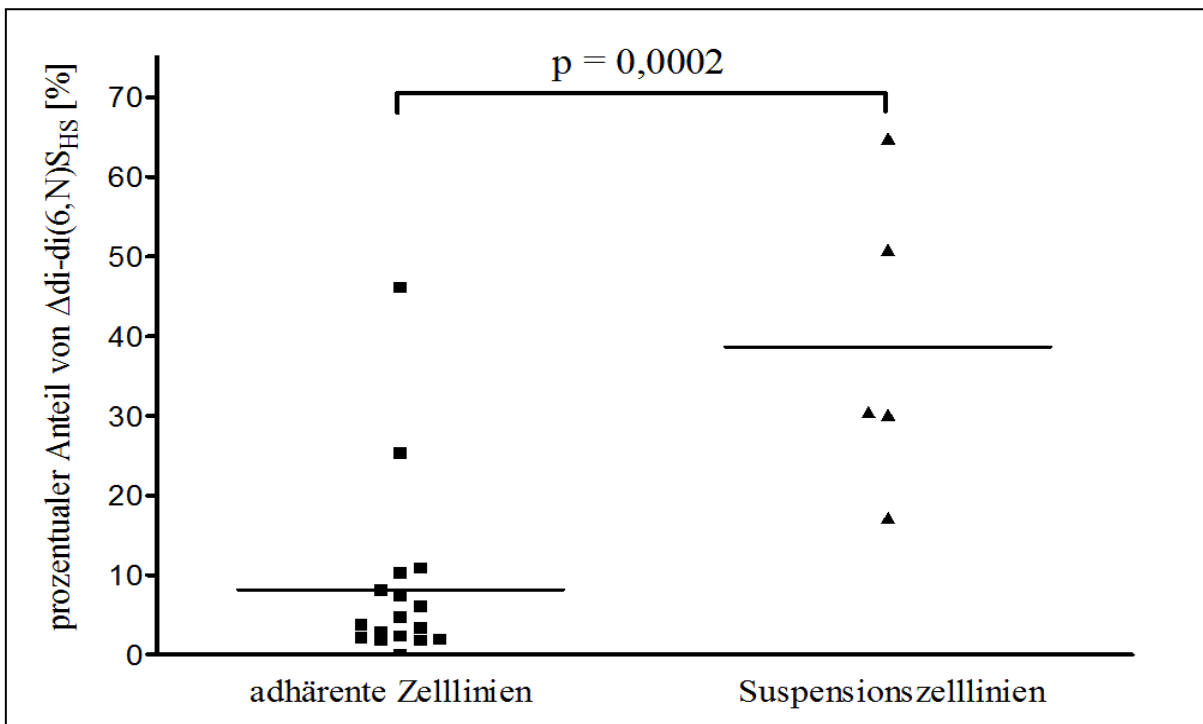


Abb. 3.15 Prozentualer Anteil von Δ di-di(6,N) S_{HS} mit Bezug auf die Zusammensetzung von HS/H im Vergleich zwischen den untersuchten adhärenen Zelllinien und Suspensionszelllinien. Die schwarzen Querlinien repräsentieren den jeweiligen Mittelwert.

3.4 Auswirkungen von Polymorphismen in *XYLT1* und *XYLT2* auf die Konzentration und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane im Serum

Die Xylosyltransferasen I und II katalysieren den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zur Bildung einer Glykosaminoglykankette an ein *Core*-Protein. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich durch Polymorphismen, durch welche die Aminosäuresequenz der XT-I oder XT-II verändert werden, direkte Auswirkungen auf die Menge und/oder Zusammensetzung von Glykosaminoglykanen ergeben würden. Die Untersuchung erfolgte mit dem Serum gesunder Blutspender, da bei Blutspendern im Gegensatz zu Patienten keine pathologischen Prozesse Einfluss auf die Biosynthese der Glykosaminoglykane nehmen. Dazu stellt Serum das wichtigste Probenmaterial für klinische Untersuchungen dar und ist in einem Zentrifugationsschritt aus geronnenem Blut verfügbar.

3.4.1 Untersuchung eines Blutspenderkollektives auf Polymorphismen

Zunächst wurden für das *Screening* bekannte Polymorphismen ausgewählt, die zu einem Aminosäureaustausch führen und mit ausreichender Häufigkeit bei Blutspendern zu finden sind [55] (Tab. 3.12).

Tab. 3.12 Darstellung der zu untersuchenden SNPs in *XYLT1* und *XYLT2*.

Gen	Exon	Bezeichnung	Aminosäureaustausch
<i>XYLT1</i>	1	c.343G>T	p.A115S
<i>XYLT2</i>	2	c.166G>A	p.D56N
<i>XYLT2</i>	6	c.1253C>T	p.P418L

Blutproben von 223 Blutspendern wurden auf die SNPs mittels RFLP-Analyse untersucht. Dabei ergab sich folgende Verteilung der Genotypen (Tab. 3.13):

Tab. 3.13 Verteilung der Genotypen für die drei untersuchten SNPs in den 223 Proben.

Genotyp	Anzahl der Personen (prozentualer Anteil)		
	Männer	Frauen	Gesamt
<i>XYLT1</i> Exon 1, c.343G>T			
GG	132 (97,8%)	82 (93,2%)	214 (96,0%)
GT	3 (2,2%)	6 (6,8%)	9 (4,0%)
TT	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>XYLT2</i> Exon 2, c.166G>A			
GG	129 (95,6%)	85 (96,6%)	214 (96,0%)
GA	6 (4,4%)	3 (3,4%)	9 (4,0%)
AA	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>XYLT2</i> Exon 6, c.1253C>T			
CC	133 (98,5%)	85 (96,6%)	218 (97,8%)
CT	2 (1,5%)	3 (3,4%)	5 (2,2%)
TT	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Davon wurden 48 Proben für die weitere Untersuchung ausgewählt, mit 23 Proben bei denen einer der 3 untersuchten SNPs gefunden worden war sowie 25 Wildtyp- bzw. Kontrollproben. Die 48 Proben umfassen ein Kollektiv von 26 männlichen und 22 weiblichen Blutspendern mit einem Durchschnittsalter von 42 ± 10 Jahren (Mittelwert \pm SEM) und wurden dem Genotyp entsprechend in 4 Gruppen unterteilt (Tab. 3.14).

Tab. 3.14 Charakteristika der untersuchten Blutspendergruppen.

Eigenschaften	Kontrolle	SNP 1	SNP 2	SNP 3
Genotyp	Wildtyp	<i>XYLT1</i> , Exon 1 c.343G>T, ht	<i>XYLT2</i> , Exon 2 c.166G>A, ht	<i>XYLT2</i> , Exon 6 c.1253C>T, ht
Probenzahl	25	9	9	5
Durchschnittsalter in Jahren (Mittelwert \pm SEM)	43 ± 11	45 ± 11	39 ± 5	36 ± 9
Geschlechterverteilung (männlich/weiblich)	15/10	3/6	6/3	2/3

(ht = heterozygote Form)

3.4.2 Analytik der Glykosaminoglykane im Serum

Für alle in der Tabelle 3.14 aufgeführten Proben wurde, ausgehend von 1 ml Serum, die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane analysiert. Alle Werte wurden entsprechend dem Gesamtproteinwert der jeweiligen Serumprobe auf den Standardwert von 72 g/l umgerechnet. Die Glykosaminoglykane bestanden im Durchschnitt zu 55% aus Δ di-mono4S_{CS} und zu 45% aus Δ di-0S_{CS}.

Tab. 3.15 Ergebnisse der Glykosaminoglykan-Analytik.

Mittelwert \pm SEM [nmol/ml]	Wildtyp	SNP 1 c.343G>T	SNP 2 c.166G>A	SNP 3 c.1253C>T
Δ -Disaccharide	34,5 \pm 3,5	27,6 \pm 3,7	35,7 \pm 2,4	33,7 \pm 1,6
Δ di-mono4S _{CS}	19,8 \pm 2,3	14,9 \pm 1,5	19,3 \pm 1,5	17,8 \pm 1,2
Δ di-0S _{CS}	14,7 \pm 1,7	12,7 \pm 2,6	16,4 \pm 1,3	15,9 \pm 1,0

Bezüglich der Δ -Disaccharide in den Serumproben ergab sich für die 26 männlichen Blutspender ein Wert von 33,7 \pm 3,0 nmol/ml (Mittelwert \pm SEM) und für die 22 weiblichen Blutspender ein Wert von 32,9 \pm 4,2 nmol/ml (Mittelwert \pm SEM). Bei alleiniger Betrachtung der 25 Blutspender aus der Kontrollgruppe war der Mittelwert mit 34,5 nmol/ml für die 15 männlichen und 10 weiblichen Blutspender übereinstimmend. Somit konnten keine Unterschiede bei der Glykosaminoglykankonzentration im Serum zwischen Frauen und Männern beobachtet werden.

Für den SNP c.343G>T konnte eine signifikante Korrelation ($p < 0,01$) mit einem verminderten Glykosaminoglykan-Gehalt im Serum im Vergleich zu der Wildtypgruppe festgestellt werden (Abb. 3.16). Sowohl Δ di-mono4S_{CS} als auch Δ di-0S_{CS} zeigten sich im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Wildypgruppe erniedrigt (Tab. 3.15).

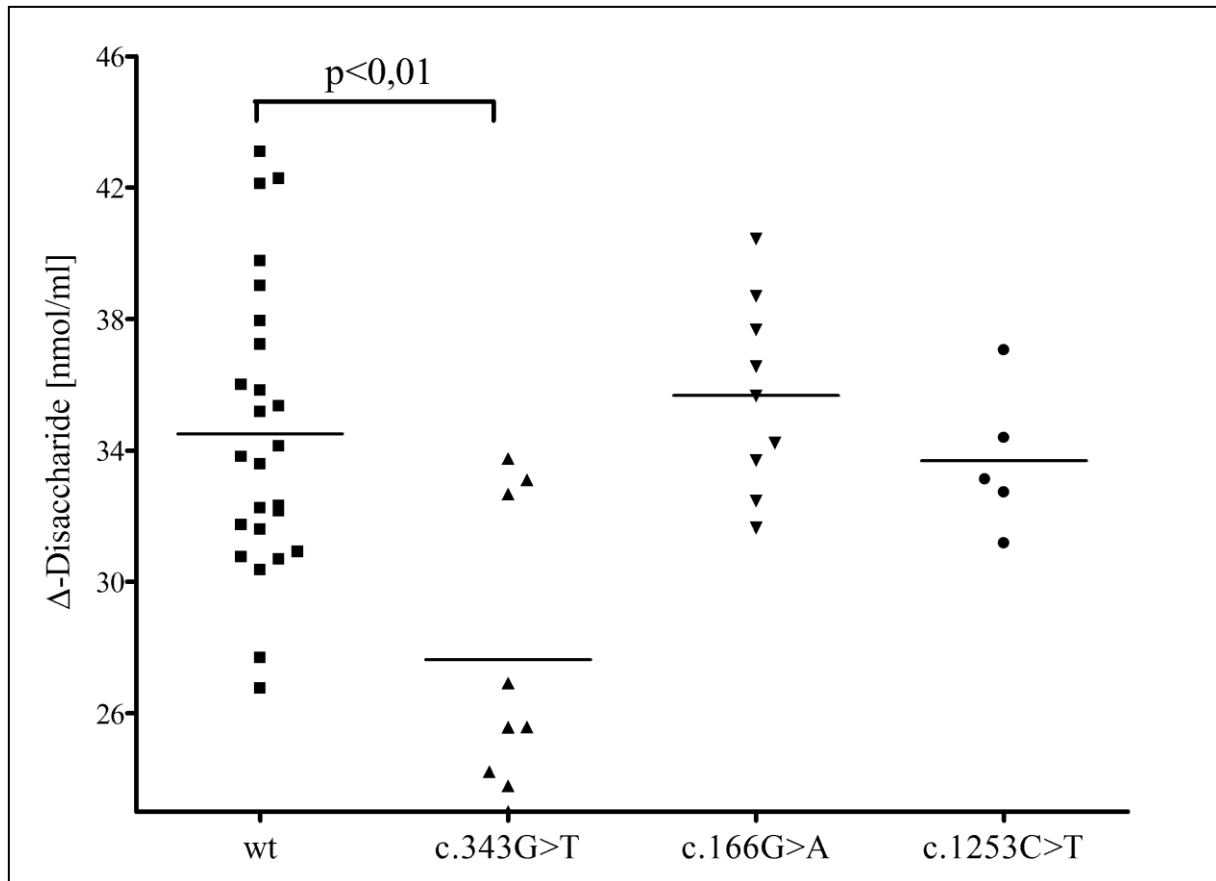


Abb. 3.16 Darstellung der Gesamtkonzentration der Δ -Disaccharide mit Einteilung auf die Wildtypgruppe und die 3 verschiedenen SNP-Gruppen. Die schwarzen Querlinien repräsentieren den Mittelwert.

3.4.3 Bestimmung der XT-Aktivität im Serum

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die untersuchten XT-SNPs einen Einfluss auf die XT-Aktivität haben. Dazu wurde für alle 48 Serumproben (Tab. 3.14) die XT-Aktivität mit dem radiochemischen Testsystem ermittelt.

Tab. 3.16 Ergebnisse der XT-Aktivitätsbestimmung im Serum.

XT-Aktivität	Wildtyp	SNP 1 c.343G>T	SNP 2 c.166G>A	SNP 3 c.1253C>T
Mittelwert \pm SEM [mU/l]	1,01 \pm 0,11	0,99 \pm 0,09	0,99 \pm 0,08	1,03 \pm 0,09

Keiner der untersuchten SNPs zeigte eine signifikante Veränderung der XT-Aktivität im Serum im Vergleich zu den Wildtypproben (Abb. 3.17).

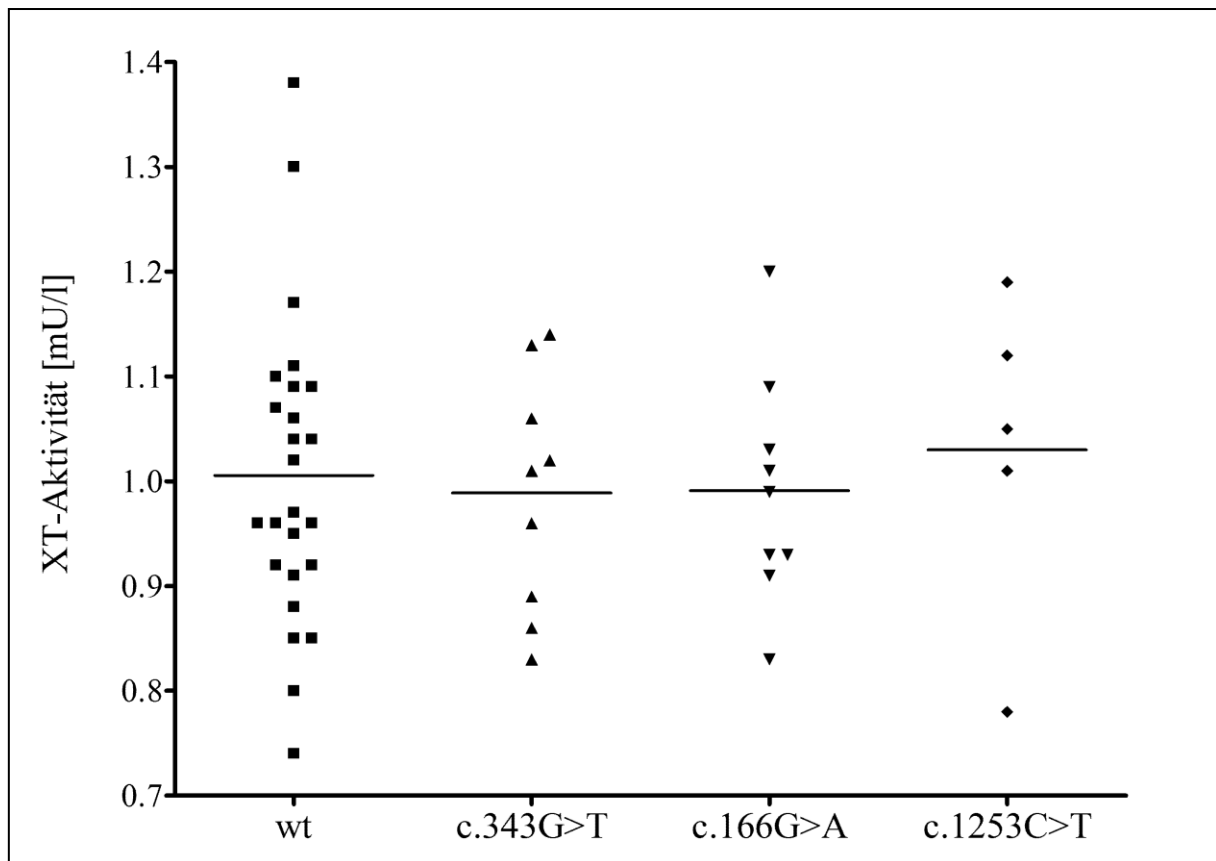


Abb. 3.17 Darstellung der XT-Aktivitäten im Serum mit Einteilung auf die Wildtypgruppe und die 3 verschiedenen SNP-Gruppen. Die schwarzen Querlinien repräsentieren den Mittelwert.

Bezüglich der XT-Aktivitäten in den Serumproben ergab sich für die 26 männlichen Blutspender sich ein Wert von $1,05 \pm 0,09$ mU/l (Mittelwert \pm SEM) und für die 22 weiblichen Blutspender ein Wert von $0,95 \pm 0,11$ mU/l (Mittelwert \pm SEM). Bei alleiniger Betrachtung der 25 Blutspender aus der Kontrollgruppe resultierte ein Mittelwert von $1,06 \pm 0,10$ mU/l (Mittelwert \pm SEM) für die 15 männlichen und $0,93 \pm 0,10$ mU/l (Mittelwert \pm SEM) für die 10 weiblichen Blutspender. Die XT-Aktivitäten waren somit im Serum der männlichen Blutspender höher als bei den weiblichen Blutspendern. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl für das Gesamtkollektiv ($p = 0,006$) als auch die Wildtypproben (wt) ($p = 0,02$) bezüglich der XT-Aktivität im Serum bei dem Vergleich zwischen Männern und Frauen (Abb. 3.18).

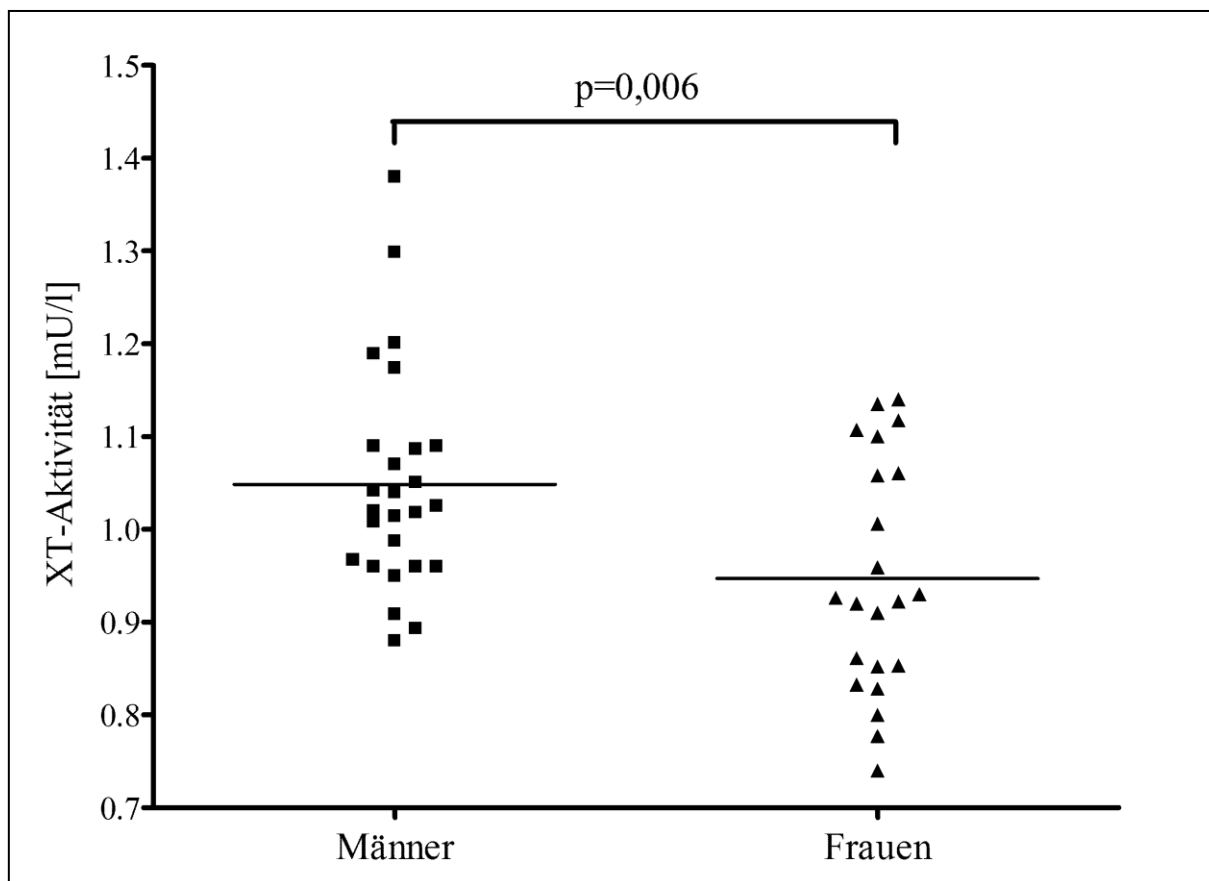


Abb. 3.18 Darstellung der XT-Aktivitäten im Serum mit dem Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Blutspendern. Die schwarzen Querlinien repräsentieren den Mittelwert.

4 Diskussion

Die Synthese der Glykosaminoglykan-Ketten erfolgt durch den initialen und geschwindigkeitsbestimmenden Transfer von Xylose auf ausgewählte Serinreste im *Core*-Protein und wird durch die Xylosyltransferasen I und II katalysiert [42, 44, 89]. Signifikante Veränderungen der XT-Aktivität konnten im Zusammenhang mit mehreren pathologischen Prozessen beobachtet werden [51-54, 90]. Veränderungen der Menge, Verteilung und Zusammensetzung von Glykosaminoglykanen wurden bei mehreren Erkrankungen wie Arteriosklerose, Krebs, Diabetes mellitus, Morbus Basedow, Interstitieller Zystitis und Osteoarthritis nachgewiesen [21-26].

4.1 Entwicklung einer Methode zur Analyse von Glykosaminoglykan Δ -Disacchariden

Zur Analyse der Zusammensetzung und Menge von Glykosaminoglykanen in einer Probe erfolgt die quantitative Bestimmung der Δ -Disaccharide nach enzymatischem Verdau der Glykosaminoglykane [2, 21, 80, 85, 88]. Eine Vielzahl von Methoden zur Trennung und Analyse der Δ -Disaccharide mit chromatographischen und elektrophoretischen Methoden sowie der Massenspektrometrie sind bisher entwickelt worden. Die Analyse mittels HPLC zählt dabei mit zu den am häufigsten eingesetzten Methoden [16, 67, 69-73, 78, 82, 83, 85, 88, 91, 92]. In den Publikationen der letzten 10 Jahre werden die Δ -Disaccharide vor der Trennung mittels HPLC zumeist mit einem Fluorophor derivatisiert. Im Vergleich zur Trennung von underivatisierten Δ -Disacchariden werden dabei erhöhte Anforderungen an die Methode gestellt, um alle Δ -Disaccharide aufzutrennen. Da alle bisher entwickelten HPLC-Methoden mit Vorsäulenderivatisierung bezüglich der Anzahl an aufgetrennten Δ -Disaccharide und der Analysenzeit Begrenzungen aufwiesen, wurde eine neue Methode entwickelt, welche möglichst viele Δ -Disaccharide in einem kurzen Zeitraum auftrennen sollte.

4.1.1 Eigenschaften der Methode im Kontext der Literatur

Kitagawa *et al.* [82, 83] entwickelten HPLC-Methoden mit Vorsäulenderivatisierung (AMAC, 2-Aminobenzamid), wobei in einem Lauf 6 Δ -Disaccharide von CS/DS und in einem weiteren Lauf 6 Δ -Disaccharide von HS/H aufgetrennt werden konnten. Dabei wurden erstmalig die Trennungen von derivatisierten Δ -Disacchariden der Gruppe 2 (CS/DS) und der Gruppe 3 (HS/H) unter Nutzung von nur einer Trennsäule und einem Puffersystem

ermöglicht. Die neu entwickelte Methode erlaubt dahingegen die Trennung von allen 9 kommerziell verfügbaren Δ -Disacchariden der Gruppen 1 und 2 (HA/CS/DS) in einem Lauf und 7 Δ -Disacchariden der Gruppe 3 (HS/H) in einem zweiten Lauf nach Vorsäulenderivatisierung und unter Nutzung von nur einer Säule und einem Puffersystem. Damit konnte die Zahl der aufgetrennten derivatisierten Δ -Disaccharide mit einem Säule-/Puffersystem von 12 auf 16 erhöht werden. Zeitgleich mit der neuen HPLC-Methode wurde eine ähnliche Methode publiziert, welche 8 Δ -Disaccharide der Gruppe 2 und 8 Δ -Disaccharide der Gruppe 3 in zwei Läufen nach Derivatisierung mit AMAC mit einem Säule-/Puffersystem trennt [93]. Allerdings konnten Deakin *et al.* zwischen zwei Paaren von Δ -Disacchariden der Gruppe 3 keine Basislinientrennung erzielen [93].

In Bezug auf die Auftrennung von derivatisierten Δ -Disacchariden können alle 9 Δ -Disaccharide der Gruppen 1 und 2 (HA/CS/DS) erstmalig in einem HPLC-Lauf getrennt werden. Davor hatten Kitagawa *et al.* [82] die Trennung von 6 und Karousou *et al.* [81] die Trennung von 5 Δ -Disacchariden der Gruppe 2 nach Markierung mit einem Fluorophor in einem HPLC-Lauf erreicht. Deakin *et al.* [93] trennten alle 8 derivatisierten Δ -Disaccharide der Gruppe 2 auf.

Für die Gesamtdauer eines HPLC-Laufes ergibt sich mit 39 min zur Trennung der derivatisierten Δ -Disaccharide der Gruppen 1 und 2 und 33 min zur Trennung der Δ -Disaccharide der Gruppe 3 eine deutliche Verbesserung zu allen anderen Methoden mit Vorsäulenderivatisierung. Während allein der Trenngradient für einen Lauf bei Kitagawa *et al.* [82] im Bereich von 60 min lag, benötigte die Methode von Deakin *et al.* nur noch 35 min [93]. Dahingegen konnte der Trenngradient mit der neuen Methode auf 23 min für die Trennung der Δ -Disaccharide der Gruppen 1 und 2 und 17 min für die Trennung der Δ -Disaccharide der Gruppe 3 deutlich verkürzt werden.

Weitere Vorteile zeigt die neue Methode im Vergleich der Quantifizierungsgrenzen mit vorherigen Methoden zur Trennung von Δ -Disacchariden nach Derivatisierung mit AMAC, welche von unter 50 pmol [82] bzw. 25 pmol [81] auf unter 0,2 pmol gesenkt werden konnten. Deakin *et al.* [93] geben eine Quantifizierungsgrenze von etwa 0,1 pmol für alle Δ -Disaccharide an.

Die Wiederfindungsrate der neuen Methode für Chondroitinsulfat A in biologischer Matrix (Serum) beläuft sich auf mindestens 97,3%. Es ist anzunehmen, dass die Wiederfindungsraten mit Serum als biologischer Matrix für andere Δ -Disaccharide auch in diesem Bereich liegen, da die gewählten Aufreinigungsschritte keine Selektion hinsichtlich der Art und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane treffen. Lediglich sehr kurze Glykosaminoglykan-Ketten könnten bei der Ultrafiltration teilweise verloren gehen. Bei der überwiegenden Zahl der Literaturmethoden gibt es keine Angabe zur Wiederfindungsrate der Extraktionsmethode. Für die Trennung von Δ -Disacchariden der Gruppen 1 und 2 wird für eine Trennung mittels LIF-CE nach Derivatisierung mit AMAC eine Wiederfindungsrate von ca. 85% für Chondroitinsulfat mit Blutplasma als biologischer Matrix angegeben [79]. Die zugehörige Aufreinigungsmethode besteht aus einem enzymatischen Verdau mit anschließender Fällung der Proteine durch Aufkochen und Aufreinigung mittels einer Anionenaustauschchromatographie. Dadurch, dass sich die neue Aufreinigungsmethode in der Durchführung in allen Schritten von diesem klassischen Aufreinigungsweg [79] unterscheidet, ist der Unterschied in der Wiederfindungsrate bei ähnlicher biologischer Matrix zu erklären.

Zusammengefasst ermöglicht die neue Methode erstmalig die Basislinientrennung von 16 verschiedenen Δ -Disacchariden der Gruppen 1, 2 und 3 in zwei Läufen nach Derivatisierung mit einem Fluorophor, wobei nur ein Säule-/Puffersystem benötigt wird. Erstmals konnte die Trennung von 9 Δ -Disacchariden der Gruppen 1 und 2 (HA/CS/DS) in einem Lauf nach Markierung mit einem Fluorophor erreicht werden. Weiterhin benötigen die jeweiligen HPLC-Trennläufe für die 9 Δ -Disaccharide der Gruppen 1 und 2 sowie die 7 Δ -Disaccharide der Gruppe 3 deutlich weniger Zeit im Vergleich zu allen publizierten Trennungen von markierten Δ -Disacchariden mittels HPLC.

4.1.2 Aufreinigung von Glykosaminoglykanen aus biologischen Proben

Die gewählten Aufreinigungsschritte wurden hinsichtlich einer vollständigen Extraktion und einer möglichst hohen Wiederfindungsrate ausgewählt bzw. optimiert. Anstelle des überwiegend eingesetzten Proteinaseverdaues wurde die Extraktion mit Natriumborhydrid gewählt, um Glykosaminoglykan-Proben jeder Art schnell und vollständig aufschließen zu können. Für die Proteinfällung ist die aufwendige TCA-Fällung deutlich effektiver als eine einfache Hitzedenaturierung. Eine Aufreinigungsschritt mit Anionenaustauschchromatographie wurde zugunsten einer hohen Wiederfindungsrate nicht in das

Aufreinigungsprotokoll integriert. Zum Abschluss der Aufreinigung erwies sich eine Entsalzung der Proben als notwendig, um den enzymatischen Verdau und die Derivatisierung mit AMAC in einem quantitativen Rahmen durchführen zu können.

4.2 Aufreinigung von Blutzellen mit anschließender Glykosaminoglykan-Analytik

Bei der Aufreinigung von Blutzellen von Blutspendern wurden Volumina von 14 ml je Blutspender eingesetzt. Ein generelles Problem stellte eine zur Detektion von Glykosaminoglykanen ausreichende Zellzahl nach der Isolierung bestimmter Blutzellen, sowie die nicht bekannte Menge an Glykosaminoglykanen je Zelle dar. Zur Zellisolierung hätte eine Aufreinigung mittels *Magnetic Cell Separation* (MACS) durchgeführt werden können, mit welcher sehr hohe Reinheiten erzielt werden können. Die Nachteile dieser Methode sind jedoch die hohen Kosten je Aufreinigungsvorgang in Verbindung mit der begrenzten Kapazität der eingesetzten Antikörper. Um eine für die Analyse der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide ausreichende Zellzahl zu erreichen, wurde deshalb die Aufreinigung mittels Zentrifugations- und Dichtezentrifugationstechniken angewandt.

4.2.1 Aufreinigung und Analyse der Glykosaminoglykane von Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden aus Erythrozytenkonzentraten entnommen und in Puffer gewaschen. Trotz einer hohen Ausgangszahl von $3,5 \cdot 10^9$ Erythrozyten je Probe konnten keine Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stimmt mit einer früheren HPLC-Analyse von Erythrozyten überein [94].

4.2.2 Aufreinigung und Analyse der Glykosaminoglykane von Thrombozyten

Die Aufreinigung von Thrombozyten erfolgte durch eine einfache Zentrifugation gefolgt von einer Dichtegradientenzentrifugation zur Erhöhung der Reinheit. Die Vorteile des Einsatzes einer Dichtegradientenzentrifugation wurden zuvor von Ford *et al.* [95] dargelegt, wobei Thrombozyten mit hoher Ausbeute und Reinheit mit dem Dichtemedium Nycodenz isoliert wurden. Anstatt einer Nycodenzlösung wurde eine Lösung des preiswerteren Dichtemediums Percoll auf die entsprechende Dichte zur Aufreinigung von Thrombozyten eingestellt.

Δ di-mono4S_{CS} ist der Hauptbestandteil der Glykosaminoglykane in Thrombozyten. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Untersuchungen der Glykosaminoglykane von Thrombozyten überein [96, 97]. Als weitere Bestandteile wurden Δ di-0S_{HA}, Δ di-0S_{CS} und Δ di-mono6S_{CS} detektiert, die zusammen einen Anteil von 5,5% der Glykosaminoglykane bei Thrombozyten ausmachten. Bei der Aufreinigung wurde eine hohe Reinheit von 99,4% erreicht. Diese Studie mit 35 Thrombozytenproben von Blutspendern ist die erste Bestimmung des Normalbereiches für die Konzentrationen der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von Thrombozyten.

4.2.3 Aufreinigung und Analyse der Glykosaminoglykane von Granulozyten

Die Aufreinigung von Granulozyten erforderte zwei Zentrifugationsschritte mit einem Dichtegradienten, um sowohl Blutzellen mit höherer als auch geringerer Dichte aufzutrennen. Im Vergleich zur Aufreinigung von Thrombozyten war die Aufreinigung wesentlich zeitaufwendiger und komplizierter. Insgesamt wurde eine hohe Reinheit der Granulozyten von durchschnittlich 98,3% in Bezug auf die Leukozyten erreicht. Kein Problem bereitete die Abtrennung der Thrombozyten mit weniger als einem Thrombozyt je 100 Granulozyten im Vergleich zu 43 Thrombozyten je 100 Granulozyten bei zwei Literaturmethoden, in welchen eine Aufreinigung über einen Dichtegradienten oder eine MACS [98] zur Isolierung eingesetzt wurde. Allerdings erzielt die MACS-Aufreinigung mit einer Reinheit der Granulozyten von über 99% in Bezug auf die Kontamination mit Leukozyten bessere Resultate als die entwickelte Dichtegradientenzentrifugation. Bei der entwickelten Aufreinigungsmethode zeigte sich eine höhere Selektivität für Neutrophile, wobei nur $3,5\% \pm 2,3\%$ (Mittelwert \pm SEM) der Granulozyten aus Eosinophilen bestanden, in Relation zu einem Anteil der Eosinophilen von $6\% \pm 2\%$ (Mittelwert \pm SEM) bei der vergleichbaren Literaturmethode [98].

Die Hauptkomponenten der Glykosaminoglykane von Granulozyten sind die Δ -Disaccharide Δ di-0S_{HA} und Δ di-mono4S_{CS} mit Δ di-mono6S_{CS} and Δ di-di(2,6)S_{CS} als weiteren Bestandteilen. Bei einer der ersten Untersuchungen zu den Glykosaminoglykanen von Leukozyten wurde HA als Nebenkompone und Chondroitin-4-sulfat als Hauptkomponente detektiert [99]. Huang *et al.* fanden bei der Analyse von Leukozyten jedoch Δ di-0S_{CS} und Δ di-mono4S_{CS}. Da diese beiden Untersuchungen jedoch alle Leukozyten umfassten, lassen sie sich nur grob mit der Analyse von Granulozyten vergleichen, welche einen Anteil von 50% bis 65% an den Leukozyten haben. In Bezug auf die Glykosaminoglykanmenge zeigt sich für Granulozyten eine wesentlich größere biologische Streuung im Vergleich zu Thrombozyten. Diese Streuung ist auch teilweise auf die Heterogenität der untersuchten Granulozyten zurückzuführen, welche neben den Neutrophilen auch noch kleinere und variable Mengen von Basophilen und Eosinophilen umfassen. Dabei machten die Basophilen aufgrund ihres geringen Anteils an den Granulozyten von unter 2% und einer teilweisen Abtrennung bei der Aufreinigung nur einen geringen Teil der aufgereinigten Granulozyten aus. Dahingegen bestanden $3,3\% \pm 2,5\%$ (Mittelwert \pm SEM) der aufgereinigten Granulozyten aus Eosinophilen. Im Vergleich zu Thrombozyten wurde bei Granulozyten ein 28 mal höherer Glykosaminoglykan-Gehalt mit Bezug auf die Zellzahl detektiert. Dieses Ergebnis ist

wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Granulozyten mit 13,5 µm einen 6 mal größeren Zelldurchmesser als Thrombozyten mit durchschnittlich 2,25 µm haben, welche zudem die kleinsten Blutkörperchen sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Komposition und die Normalverteilung der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide in humanen Granulozyten von Blutspendern bestimmt.

4.3 Analytik der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von humanen Zellkulturlinien

Die zweidimensionale Kultivierung von humanen Zelllinien dient als Modell zur Untersuchung von physiologischen Prozessen und menschlichen Erkrankungen. Das Zellkulturmodell kann dabei als vergleichsweise einfaches System zur Klärung komplexer Fragestellungen eingesetzt werden. Gleichzeitig weisen immortalisierte Zelllinien als Modell der Vorgänge im Organismus hinsichtlich der Relevanz von Ergebnissen für die Prozesse im Organismus auch Einschränkungen auf. Deshalb sind die Ergebnisse im Kontext zu Untersuchungen an Patienten und Versuchstieren zu betrachten.

Veränderungen in der Menge und Verteilung von Glykosaminoglykanen wurden bei vielen humanen Erkrankungen beobachtet. Eine Beteiligung dieser Veränderungen an pathologischen Prozessen bei Erkrankungen wie Arteriosklerose, Krebs, Diabetes mellitus, Morbus Basedow, Interstitieller Zystitis und Osteoarthritis wurde nachgewiesen [21-26]. Die Rolle der Glykosaminoglykane bei Krebs und Osteoarthritis wurde im Zellkulturmodell untersucht [29-31, 100]. Dennoch existieren für die Mehrzahl der humanen Zelllinien nur begrenzte oder keine Daten zur Menge und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane. Zur Erstcharakterisierung und für die ersten Vergleiche zwischen verschiedenen Zelllinien wurde die Zusammensetzung der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide von 22 verschiedenen humanen Zelllinien untersucht.

Bei Betrachtung der Gesamtmenge der Δ -Disaccharide je 10^6 Zellen zeigte sich für die Zelllinie Hs-27 der höchste Wert. Eine Erklärung hierfür wäre, dass Hs-27 Zellen den mit Abstand größten Zelldurchmesser von allen untersuchten Zelllinien zeigten. Weiterhin ergab sich ein signifikant erniedrigter Wert für die 5 untersuchten Suspensionszelllinien im Vergleich zu den 17 adhären Zellen. Beide Gruppen umfassen Zelllinien von verschiedenen Gewebetypen. So befinden sich unter den adhären Zellen Karzinomzellen, Sarkomzellen und Fibroblasten, während zu den untersuchten Suspensionszelllinien hämatonkologische Tumorzellen und Blastome (embryonale Tumore) gehören. Somit zeigte sich hier ein Unterschied im Glykosaminoglykan-Gehalt sowohl zwischen Zelllinien unterschiedlicher Herkunft als auch zwischen adhären Zelllinien und Suspensionszelllinien. Dieser Unterschied war für die Glykosaminoglykane der Gruppe 3 (HS/H) am stärksten ausgeprägt. Dabei stellt sich die Frage, ob Heparansulfatproteoglykane möglicherweise in adhären Zellen für Prozesse der Zellinteraktion benötigt werden, welche bei Suspensionszellen nicht oder weniger von Bedeutung sind.

Auch in der Zusammensetzung der Glykosaminoglykane der Gruppe 3 zeigten sich für zwei verschiedene Δ -Disaccharide je 10^6 Zellen signifikante Unterschiede zwischen adhärennten Zelllinien und Suspensionszelllinien. Dabei waren bei Suspensionszellen die prozentualen Anteile von Δ di-0S_{HS} signifikant erniedrigt und die von Δ di-di(6,N)S_{HS} signifikant erhöht gewesen. Weiterhin wurden die Δ -Disaccharide Δ di-mono6S_{HS} und Δ di-di(2,N)S_{HS} nur in adhärennten Zelllinien nachgewiesen. Da man davon ausgeht, dass bestimmte Abfolgen von Δ -Disacchariden in Heparansulfatproteoglykanen für zielgerichtete Prozesse im Bereich Zelladhäsion, Zellmigration und Zelldifferenzierung von Bedeutung sind [17], könnten diese Unterschiede in der Zusammensetzung der Glykosaminoglykane der Gruppe 3 mit den differenzierten Funktionen von Heparansulfatproteoglykanen in adhärennten Zellen und Suspensionszellen zusammenhängen.

Für die Zusammensetzung der Glykosaminoglykane der Gruppe 2 ergaben sich keine offensichtlichen Unterschiede bei Unterteilung der Zelllinien nach Gewebetyp bzw. beim Vergleich zwischen adhärennten Zelllinien und Suspensionszelllinien. Im Gegensatz zu den Heparansulfatproteoglykanen ist die Bedeutung der Glykosaminoglykane CS und DS hinsichtlich der Steuerung biologischer Prozesse über spezifische Sequenzen von Δ -Disacchariden noch weitgehend unerforscht. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass CS und DS in inflammatorischen Prozessen die Aktivität von Wachstumsfaktoren regulieren [101].

Δ di-0S_{HS} wurde als Hauptbestandteil von HS und H detektiert. Dazu wurden je nach Zelllinie noch zwei weitere Δ -Disaccharide mit je einer und zwei Δ -Disaccharide mit je zwei Sulfatgruppen gefunden. Für CS und DS wurden nur drei verschiedene Δ -Disaccharide mit je einer Sulfatierung in den Zelllinien nachgewiesen. Damit ergab sich für die Glykosaminoglykane der Gruppe 2 ein höherer Sulfatierungsgrad, während die Glykosaminoglykane der Gruppe 3 eine variablere Δ -Disaccharid-Zusammensetzung aufwiesen. Möglicherweise ist diese variable Zusammensetzung mit Unterschieden in der Sulfatierung der Δ -Disaccharide eine Voraussetzung für eine zielgerichtete Beteiligung der Heparansulfatproteoglykane bei vielen biologischen Prozessen. In diesem Zusammenhang werden neue Untersuchungsmethoden für Glykosaminoglykane benötigt, welche die Sequenz der Δ -Disaccharide bestimmen können.

Zur Bestätigung der Unterschiede in der Menge und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane zwischen adhärennten Zelllinien und Suspensionszelllinien sollte eine

größere Zahl weiterer humaner Zellkulturzelllinien untersucht werden. Um festzustellen, ob die Unterschiede in der Zusammensetzung und Menge der Heparansulfatproteoglykane mit funktionellen Unterschieden zusammenhängen, müssen die Funktionen der Proteoglykane bei Zellkulturzellen tiefergehend erforscht und verstanden werden.

Eine Variante der Kultivierung stellt das Wachstum adhärenter Zellen in einer dreidimensionalen Matrix dar. Da die Zellen im Organismus ebenfalls in einem dreidimensionalen Zellverband vorliegen, sollen mit dieser aufwendigeren Kultivierungsform Ergebnisse erzielt werden, welche mit geringeren Einschränkungen den Vorgängen im Organismus entsprechen. Kürzlich wurden Primärfibroblasten aus Sehnen unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf ihre Expressionsrate von Proteoglykanen hin untersucht [102]. Dabei ergab sich ein deutlicher Anstieg in der Expression von Syndekan-4 während der dreidimensionalen Kultivierung in einem Kollagengel im Vergleich zur zweidimensionalen Kultivierung.

Zusammengefasst wurden erstmalig die Δ -Disaccharide der Glykosaminoglykane von 22 verschiedenen humanen Zelllinien in zweidimensionaler Kultivierung analysiert und quantifiziert. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied bezüglich der Glykosaminoglykanmenge und Zusammensetzung zwischen den untersuchten adhärenen Zelllinien und den Suspensionszelllinien.

4.4 Einfluss von Polymorphismen in den Genen *XYLT1* und *XYLT2* auf die Glykosaminoglykane im Serum

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob SNPs in den Genen von *XYLT1* und *XYLT2* konkrete Auswirkungen auf die Menge und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane haben. Dazu wurden Proben von 223 Blutspendern auf 3 SNPs hin untersucht, welche je einen Aminosäureaustausch in XT-I oder XT-II zur Folge haben. Danach erfolgte die Analyse der Glykosaminoglykane in allen Proben mit SNPs und 25 Kontrollproben.

Viele Erkrankungen wie Diabetes und Osteoarthritis werden von Veränderungen im Metabolismus der Glykosaminoglykane begleitet. Daher können bei den entsprechenden Patienten mittels Analyse von Gewebe-, Serum- und/oder Urinproben Unterschiede für die Menge und Zusammensetzung der Glykosaminoglykane im Bezug auf Proben von gesunden Probanden detektiert werden. Deshalb wird untersucht, ob die Bestimmung der Glykosaminoglykane im Serum oder Urin als Marker für den Schweregrad und den Verlauf von Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Morbus Basedow oder Pseudoxanthoma elasticum geeignet ist [23, 24, 103, 104].

Genetische Polymorphismen in den Genen, welche für die Biosynthese der Glykosaminoglykane relevant sind, können einen Risikofaktor hinsichtlich der Entwicklung und dem Schweregrad von Erkrankungen darstellen, welche mit Veränderungen im Metabolismus der Glykosaminoglykane einhergehen. XT-I und XT-II katalysieren den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Biosynthese der Glykosaminoglykane der Gruppen 2 und 3 (CS, DS, HS und H). Es wurde untersucht, ob ausgewählte Polymorphismen in den Genen *XYLT1* und *XYLT2*, die einen Austausch einer Aminosäure in XT-I oder XT-II zur Folge haben, zu Veränderungen in der Menge oder Zusammensetzung der Glykosaminoglykane im Serum führen. Dazu wurden Serumproben von gesunden Blutspendern anstelle von Patienten eingesetzt, um Veränderungen der Konzentrationen der Glykosaminoglykane im Serum durch pathologische Mechanismen bei Patienten zu vermeiden.

In Übereinstimmung mit der Literatur [104] wurde keine Assoziation zwischen dem Geschlecht der Blutspender und der Menge der Glykosaminoglykane im Serum gefunden. Der *XYLT1* SNP c.343G>T war im heterozygoten Status mit einem signifikant vermindertem

Glykosaminoglykan-Gehalt im Serum assoziiert. Dabei wurden die Ergebnisse des Glykosaminoglykan-Gehaltes im Serum von 25 Blutspendern, welche keinen der drei untersuchten SNPs aufwiesen, zum Vergleich herangezogen.

In Übereinstimmung mit der Literatur [46, 104] wurden erhöhte XT-Aktivitäten im Serum männlicher Blutspender im Vergleich zu weiblichen Blutspendern gefunden. Die Ursache für diesen Unterschied ist bislang noch unerforscht. Obwohl die Werte für die Gesamtmenge der Glykosaminoglykane verringert waren, zeigte sich keine Verminderung für die XT-Aktivität in den Serumproben der Blutspender mit dem *XYLT1* SNP c.343G>T im Vergleich zu den Kontrollproben der 25 Blutspender ohne SNPs. Der Aminosäureaustausch ist in der Stammregion der XT-I lokalisiert, welche die Proteinaseschnittstelle für die Bildung der löslichen Form der XT-I beinhalten soll. Die Stammregion sorgt darüber hinaus für die korrekte Lokalisation der XT-I im Golgiapparat [40]. Deshalb besteht ein Grund zu der Vermutung, dass der SNP c.343G>T die Lokalisation der XT-I in den Zisternen des cis-Golgi-Netzwerkes und damit auch die Biosynthese der Glykosaminoglykane beeinflusst. Dadurch könnte die Biosynthese der Glykosaminoglykane mit Bezug auf die Xylosylierung von Serinresten durch die XT-I weniger effektiv erfolgen, so dass ein verminderter Glykosaminoglykan-Gehalt im Serum feststellbar ist. Damit, dass der Aminosäureaustausch nur die Lokalisation nicht aber die enzymatische Aktivität der XT-I beeinflussen würde, wären normale Werte für die XT-Aktivität im Serum zu erklären.

Um zu verstehen, wie sich der *XYLT1* SNP c.343G>T auf die Glykosaminoglykan-Biosynthese auswirkt, muss die Bedeutung des Austausches von Alanin zu Serin in der Position 125 der Stammregion der XT-I genauer untersucht werden. Dabei sind die Fragen zu klären, ob der Aminosäureaustausch die Generierung der löslichen Form der XT-I oder die korrekte Lokalisation der XT-I im Golgiapparat beeinträchtigt. Weiterhin ist die Untersuchung einer größeren Gruppe von Blutspendern notwendig, um die Ergebnisse zu bekräftigen. Die Messungen der Glykosaminoglykane im Serum könnten mit zusätzlichen Analysen der Glykosaminoglykane im Urin ergänzt und bekräftigt werden. Zusammengefasst wurde bei der Untersuchung eine Assoziation zwischen dem *XYLT1* SNP c.343G>T und verminderten Konzentrationen von Glykosaminoglykanen bei gesunden Blutspendern gefunden.

4.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelte HPLC-Methode stellt einen wichtigen Schritt für eine möglichst einfache, umfangreiche, schnelle und in jedem Labor mit einer konventionellen HPLC-Anlage durchführbare Analyse von Glykosaminoglykanen dar. Darüber hinaus ermöglicht die derzeitige Weiterentwicklung der HPLC-Technik in Richtung einer Miniaturisierung von Trennsäulen und Detektionszellen eine enorme Verbesserung hinsichtlich der Nachweisgrenzen für Analyten. Somit sind in der Zukunft neue HPLC-Methoden für die Trennung der Glykosaminoglykan Δ -Disaccharide zu erwarten, die mit einer deutlich geringeren Probenmenge und damit einer handlicheren und schnelleren Extraktion und Aufreinigung der Glykosaminoglykane einhergehen werden. Zusätzlich werden in Zukunft neue Methoden notwendig sein, um die Sequenzfolge der Δ -Disaccharide in einem Glykosaminoglykan zu bestimmen. Erst dann wird es in einem größeren Umfang als bisher möglich sein, Sequenzfolgen von Δ -Disacchariden zu bestimmen und in ihrer Bedeutung zu erforschen.

Der im Rahmen dieser Arbeit detektierte Unterschied zwischen adhärenenten Zelllinien und Suspensionszelllinien bezüglich der Zusammensetzung der Heparansulfatproteoglykane sollte durch die Charakterisierung weiterer humaner Zelllinien bekräftigt werden. Mittels einer Verstärkung oder Verminderung der Expression bestimmter Proteoglykane konnte in der Literatur ein maßgebender Einfluss auf das Wachstumsverhalten von humanen Zellkulturlinien dargestellt werden. Hier stellt sich die Frage, ob eine Veränderung in der Expression eines Proteoglykanes bei verschiedenen Zelllinien einen ähnlichen Effekt bewirkt, und inwieweit das *Core*-Protein und/oder die Glykosaminoglykan-Ketten das Wachstumsverhalten bestimmen können.

Für die Bedeutung des *XYLT1* SNPs c.343G>T ist zu untersuchen, wie und wie stark die XT-I in ihrer katalytischen Funktion eingeschränkt wird und ob eine Heraufregulation der XT-II diesen Effekt in den verschiedenen Organen zum Teil kompensiert. Dazu wären für den XT-Aktivitätstest spezifische Akzeptoren hilfreich, die eine getrennte Bestimmung der XT-I-Aktivität und der XT-II-Aktivität in biologischen Proben ermöglichen. Ein Modell für die möglichen klinischen Auswirkungen einer mehr oder weniger stark verminderten XT-I-Aktivität wäre eine XT-I *knockout*-Maus und die Betrachtung ihrer pathologischen Merkmale.

5. Methoden

5.1 Gewinnung von Blutzellen und Serum

5.1.1 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Vollblut von Blutspendern wird nach der Gerinnung für 10 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. Das Serum wird vorsichtig mit einer Einmalpipette abgenommen und kann bei -20 °C gelagert werden.

5.1.2 Isolierung von Erythrozyten

Die Erythrozytenproben werden aus Erythrozytenkonzentraten entnommen. Die Erythrozyten werden dreimal hintereinander in Hepespuffer gewaschen, um das Plasma zu entfernen.

5.1.3 Isolierung von Thrombozyten aus EDTA-Blut

Mit EDTA antikoaguliertes Blut wird für 10 min bei 110 g zentrifugiert. Die obere, gelbliche Phase, das plättchenreiche Plasma (PRP), wird abgenommen. In einem 15 ml Reaktionsgefäß werden 8 ml einer Percolllösung (1,063 g/ml, 0,15 M NaCl) vorsichtig mit 4 ml PRP überschichtet und 15 min bei 350 g ohne Bremse zentrifugiert. Die obere, thrombozytenreiche Phase wird abgenommen mit dem gleichen Volumen Hepespuffer in einem 15 ml Reaktionsgefäß vermischt und anschließend bei 950 g für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgeschüttet und die Plättchen werden in 6 ml Hepespuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation der Thrombozyten (20 min, 650 g) werden die Thrombozyten wieder in Hepespuffer resuspendiert und ein letztes Mal abzentrifugiert (20 min, 850 g).

5.1.4 Isolierung von Granulozyten aus EDTA-Blut

Frisches EDTA-Blut wird mit dem gleichen Volumen Hepespuffer verdünnt. In 15 ml Reaktionsgefäßen werden je 5 ml einer Percolllösung (1,095 g/ml, 0,15 M NaCl) vorgelegt und vorsichtig mit 4 ml des verdünnten EDTA-Blutes mit einer Einmalpipette überschichtet, wobei sich das Blut und die Percolllösung nicht vermischen dürfen. Nach einer Zentrifugation (25 min, 800 g, 20 °C) ohne Bremse wird die Zellschicht zwischen Plasma und Percolllösung vollständig abgenommen und in einem 50 ml Reaktionsgefäß mit Hepespuffer verdünnt. Nach einer Zentrifugation (15 min, 450 g) ohne Bremse wird der Überstand vorsichtig abgekippt und das Zellpellet wird in 5 ml Hepespuffer resuspendiert. In einem 15 ml Reaktionsgefäß

werden 5 ml Ficoll vorgelegt und vorsichtig mit der Zelllösung überschichtet. Nach einer Zentrifugation (25 min, 400 g, 20 °C) ohne Bremse wird der Überstand mit den Monozyten und Lymphozyten sorgfältig abgenommen und verworfen. Das Granulozytenpellet wird in 13 ml Hepespuffer resuspendiert und dann in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Granulozyten werden abschließend durch drei Waschschrte (Zentrifugation: 10 min, 400 g mit anschließender Aufnahme in Hepespuffer) von Plasma, Percoll und Ficoll gereinigt.

5.2 Glykosaminoglykan-Analytik

5.2.1 Isolierung der Glykosaminoglykane aus Probenmaterial

Bei allen wässrigen Proben erfolgt zunächst die Fällung der Proteoglykane und Glykosaminoglykane mit 4 Volumina 99% vergälltem Ethanol bei -20 °C über Nacht. Proben mit einer kleinen Flüssigkeitsmenge werden alternativ im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die trockene Probe wird mit einer ausreichenden Menge (4- bis 5-faches Volumen der Probe) einer Lösung von 1 M Natriumborhydrid in 0,5 M Natronlauge versetzt und über Nacht bei 37 °C behandelt. Dabei löst sich das Pellet auf und die Glykosaminoglykan-Ketten werden von den Proteoglykanen abgespalten. Im nächsten Schritt wird die Natriumborhydridlösung im Ansatz durch Zugabe von 6 M Salzsäure unter Eiskühlung neutralisiert. Je nach Probe kann dieser Schritt mit einer starken Schaumbildung einhergehen und sollte in einem ausreichend großen Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Danach wird durch Zugabe einer konzentrierten Trichloressigsäurelösung (TCA) eine TCA-Konzentration von 10% eingestellt. Zur Fällung der Proteine wird die Probe 30 min auf Eis belassen. Danach werden die Proteine 10-15 min bei 4 °C mit maximaler Zentrifugationsgeschwindigkeit abzentrifugiert. Der Überstand wird vollständig in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt und mit 4 Volumina einer Lösung von 5% Kaliumacetat in 99% vergälltem Ethanol versetzt. Die Proben werden über Nacht bei -20 °C gelagert, wobei die Glykosaminoglykane und Salzbestandteile ausfallen. Nach Zentrifugation für 10-15 min bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit wird der Überstand abgekippt und das Probenpellet im Vakuumkonzentrator vollständig getrocknet. Zum Entsalzen wird die Probe in 0,5 ml HPLC-Wasser gelöst und in eine Vivascience 500 PES 3 kDa Ultrafiltrationseinheit pipettiert. Danach wird die Probe 4 mal für je 25 min bei 14 800 g zentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wird der Durchfluss verworfen und das Retentat mit 0,4 ml HPLC-Wasser aufgefüllt und vermischt. Das Retentat wird in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, getrocknet, in 300 µl HPLC-Wasser gelöst und

gleichmäßig auf drei PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Alle drei Ansätze werden im Vakuumkonzentrator getrocknet. Ein Ansatz wird zum Verdau von CS, DS und HA in 45 µl Ammoniumacetatpuffer (pH 8, 50 mM) gelöst und nach Zugabe von 5 µl einer Lösung von Chondroitinase ABC (1 U/ml in 0,01% BSA) bei 37 °C über Nacht verdaut. Der zweite Ansatz wird zum Verdau von HS/H in 35 µl Ammoniumacetatpuffer gelöst (20 mM Ammoniumacetat, 4 mM Ca-Acetat, pH 7,1) und mit je 5 µl der Lösungen der Heparinasen 1, 2 und 3 (0,1 U/ml in 0,01% BSA) versetzt. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 35 °C. Der dritte Ansatz bleibt als Kontrolle unverdaut. Die verdauten Ansätze werden im Vakuumkonzentrator getrocknet und können vor der Derivatisierung stabil bei -20 °C gelagert werden.

5.2.2 Derivatisierung mit 2-Aminoacridon (AMAC)

2,1 mg AMAC werden in 100 µl einer Mischung aus 15 µl Essigsäure und 85 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. 5 µl dieser Lösung werden auf das Probenpellet gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 6,284 mg Natriumcyanoborhydrid werden in 100 µl Wasser gelöst (1 M Lösung). Je 5 µl werden zu jedem Reaktionsansatz gegeben. Die Derivatisierung erfolgt über 4 h bei 45 °C oder alternativ über Nacht bei 37 °C im Dunkeln. Nach der Derivatisierung wird die Probe mit einer Lösung aus 50% DMSO/50% HPLC-Wasser auf 200 µl verdünnt und kann über Monate bei -20 °C oder einige Wochen bei 4 °C lichtgeschützt gelagert werden.

5.2.3 HPLC-Analytik

Die Analyten werden mit einer Gradientenelution aufgetrennt. Dabei wird ein Gradient zwischen einem Ammoniumacetatpuffer (60 mM, pH 5,6) und dem Eluent Acetonitril gefahren. Die Trennung erfolgt mit der HPLC-Säule Waters X-Bridge Shield (3,5 µm, 100 mm x 4,6 mm I.D.) bei einer Flussrate von 1,66 ml/min. Zunächst wird die Säule mit 98% Puffer und 2% Acetonitril für 8 min äquilibriert. Danach erfolgt die Injektion von 10 µl Probe mit einem Direktinjektionsautosampler. Weiter werden die Analyten nach folgendem Programm aufgetrennt:

Tab. 5.1 HPLC-Programm zur Trennung der Δ -Disaccharide der Gruppen 1 und 2 (HA und CS/DS) mittels linearer Gradienten.

Dauer des Schrittes [min]	Ammoniumacetatpuffer [%]	Acetonitril [%]
1 min	98	2
2 min	98-96	2-4
23 min (Trenngradient)	96-85	4-15
5 min (Spülung)	40	60

Zur Trennung der Δ -Disaccharide der Gruppe 3 (HS/H) wird lediglich ein zeitlich verkürzter Trenngradientenschritt von 17 min anstatt 23 min durchgeführt.

Die Detektion der Glykokonjugate erfolgt mittels Fluoreszenzdetektion mit einer Anregungswellenlänge von 442 nm und einer Detektion bei einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Unter Berücksichtigung der Retentionszeiten, der Negativkontrolle und mit Standarddisacchariden gespickten Proben werden die Peaks identifiziert und anhand ihrer Peakfläche mit der Shimadzu LC solution post-run analysis Software quantifiziert.

5.3 Bestimmung der Xylosyltransferase-Aktivität

5.3.1 Radiochemischer XT-Test

Im radiochemischen XT-Test wird das Seidenfibroin des Seidenspinners als Substrat verwendet. Die Aminosäuresequenz beinhaltet repetitive Bereiche (GSGAGAGA)_n [105], welche als Consensus-Sequenz für die Xylosylierung dienen. Vor der Verwendung der Seide als Akzeptor muss diese in eine für die Xylosylierung geeignete Form überführt werden. Die Seide wird dazu in einer Lithiumthiocyanatlösung solvatisiert [106]. Im Anschluss daran wird die Lösung 72 h gegen Wasser dialysiert und danach mit 0,1 M Tris/HCl pH 7,0 äquilibriert. Als Substrat dient radioaktive UDP-[¹⁴C]Xylose. Die Menge der auf die Serinreste des Seidenfibroins übertragenen [¹⁴C]Xylose ist hierbei proportional der XT-Aktivität im Testansatz.

Es werden 50 µl Probe mit 50 µl Substratreagenz vermischt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Von den Reaktionsansätzen werden je 90 µl auf Nitrocellulose-Membranen

pipettiert und für 2 h bei RT getrocknet. Die Membranen werden in Szintillationsgefäße überführt und nach dem folgenden Protokoll gewaschen:

10 min mit je 3 ml 10% TCA (Präzipitation des Proteins auf der Nitrocellulose)

15 min mit je 3 ml 5% TCA (Abwaschen ungebundener UDP-[¹⁴C]Xylose mit 5% TCA)

10 min mit je 4 ml 5% TCA

15 min mit je 3 ml 5% TCA

Substratreagenz: 10 µl UDP-[¹⁴C]Xylose (50 pM; 9,78 GBq/mmol)
30 µl 1%-iges solvatisiertes Seidenfibroin
5 µl MES-Puffer (0,5 M 4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl,
0,1 M KF, pH 6,5)
5 µl Salzlösung (100 mM MnCl₂, 100 mM MgCl₂, 100 mM KCl)

Abschließend wird zu jeder Nitrocellulose-Membran 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert und die Radioaktivität nach 12 h Inkubation im β-Counter gemessen.

5.3.2 XT-Aktivitätstest mittels HPLC-Elektronenspray-Ionisations-Massenspektroskopie (HPLC-ESI-MS)

Grundlage dieser Methode ist der gekoppelte Einsatz einer Auftrennung des Reaktionsproduktes mittels HPLC mit einer anschließenden Ionisierung und massenspektrometrischen Detektion im ESI-MS-Gerät [47].

Für die Bestimmung der XT-Aktivität werden jeweils 50 µl Probe (Zellkulturüberstand, Zelllysate oder Serum) mit 50 µl Substratreagenz vermischt und für 90 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden für 15 min bei 99 °C größere Proteine in der Lösung denaturiert und durch Zentrifugation bei 20 000 g für 30 min aus der Lösung entfernt. Der klare Überstand wird abgenommen und kann für die HPLC-Auftrennung mit anschließender ESI-MS-Detektion verwendet werden. Dazu wird er zuvor in einem Injektionsvial im Verhältnis 1 zu 10 mit HPLC-Wasser verdünnt.

Substratreagenz: 20 µl K1-Peptid-Lösung
(Biotin-NH-QEEEGSGGGQKK(5'-Fluoreszein)-CONH₂) (OD₄₅₀=0,4)
20 µl UDP-Xylose (80 µg/ml)
5 µl MES-Puffer (0,5 mM 4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl,
0,1 M KF, pH 6,5)
5 µl Salzlösung (0,1 M MnCl₂, 0,1 M MgCl₂, 0,1 M KCl)

5.4 Zellkultur

5.4.1 Zelllinien und Zellmedien

Alle Zellkulturarbeiten werden unter einer sterilen Werkbank mit sterilem Einwegmaterial durchgeführt. Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgt in sterilen Zellkulturflaschen bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5% CO₂/95% Luft bei 100% Luftfeuchtigkeit. Alle eingesetzten Medien werden auf Konzentrationen von 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin eingestellt.

Es werden folgende humanen Zelllinien und Medien eingesetzt:

1301	(T-Zell Leukämie)	RPMI 1640 + 10% fötales Kälberserum (FCS)
A-431	(epidermoides Karzinom)	RPMI 1640 + 10% FCS
A-549	(Lungenkarzinom)	DMEM + 10% FCS
BM-1604	(Prostatakarzinom)	RPMI 1640 + 15% FCS
CAPAN-1	(Pankreas-Adenokarzinom)	RPMI 1640 + 15% FCS
CAPAN-2	(Pankreas-Adenokarzinom)	RPMI 1640 + 15% FCS
Chang Liver	(Gebärmutterhalskrebs)	RPMI 1640 + 10% FCS
EA.hy926	(hybrides Endothel)	DMEM + 10% FCS
HEK-293	(embryonale Niere)	DMEM + 10% FCS
Hs27	(Dermalfibroblast)	DMEM + 10% FCS
HT-1080	(epitheliales Fibrosarkom)	DMEM + 10% FCS
HT-29	(Dickdarmadenokarzinom)	RPMI 1640 + 10% FCS
hTERT-BJ1	(immortalisierte Fibroblasten)	DMEM + 10% FCS
K-562	(chronische, myeloische Leukämie)	RPMI 1640 + 10% FCS
LNCAP	(Prostatakarzinom)	RPMI 1640 + 10% FCS
MHH-ES-1	(Ewing's Osteosarkom)	RPMI 1640 + 10% FCS
SAOS-2	(Osteosarkom)	RPMI 1640 + 10% FCS
SW 1353	(Chondrosarkom)	RPMI 1640 + 10% FCS
SW 982	(Synoviales Sarkom)	RPMI 1640 + 10% FCS
THP-1	(akute monocytische Leukämie)	RPMI 1640 + 10% FCS
WERI-RB-1	(Retinoblastom)	RPMI 1640 + 10% FCS
Y-79	(Retinoblastom)	RPMI 1640 + 15% FCS

5.4.2 Auftauen von Zelllinien

10 ml Medium werden in einer Petrischale vorgelegt. Das Kryoröhrchen wird aus dem Stickstofftank entnommen und sofort auf Eis gelegt. Unter der Zellkulturbank wird das Röhrchen in der Hand aufgewärmt, bis sich das Eis von der Wandung löst und in die Petrischale gekippt werden kann. Unter Schwenken der Petrischale schmilzt das Eis und die Zellen werden gleichmäßig verteilt. Um das DMSO zu entfernen, wird das Medium am nächsten Tag gewechselt.

5.4.3 Passagieren von Zellen

Die Kultivierung erfolgt für alle Zelllinien mit 10 ml des entsprechenden Mediums in Petrischalen und mit 25 ml Medium in 175 cm² Zellkulturflaschen. Alle drei Tage erfolgt ein Mediumswechsel um verbrauchte Mediumsbestandteile neu zuzuführen und Stoffwechselprodukte zu entfernen. Wenn die adhärennten Zellen darüber hinaus eine Konfluenz von 80% bis 90% erreicht haben, werden sie passagiert, um eine maximale Zellteilungsrate ohne Kontaktinhibierung und Nährstoffmangel zu gewährleisten. Dabei wird zunächst das alte Medium abgesaugt und die Zellen werden einmal mit 5 ml (Petrischale) bzw. 15 ml (Zellkulturflasche) *dulbecco's phosphate buffered saline* (DPBS) gewaschen. Danach werden 5 ml bzw. 15 ml einer auf 37 °C vorgewärmten 1x Trypsin/EDTA-Lösung auf die Zellen pipettiert und es folgt je nach Zelllinie eine Inkubation von 5 min bis maximal 10 min im Zellkulturschrank. Wenn eine vollständige Ablösung der Zellen erfolgt ist, wird Medium zum Stoppen der Trypsinierung zugegeben. Die Zellsuspension wird in ein steriles Greinerröhrchen pipettiert und die Zellen werden 5 min bei 1000 g abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wird je nach Wachstumsrate der Zelllinie ein Teil der Zellen erneut ausgesät. Suspensionszellen werden zum Mediumswechsel oder Passagieren in ein Greinerröhrchen überführt, abzentrifugiert (1000 g, 5 min) und in neuem Medium resuspendiert.

5.4.4 Zellernte und Zellzahlbestimmung

Nach der Passagierung eines Teiles der Zellen von einer 175cm² Zellkulturflasche in zwei 175cm² Zellkulturflaschen erfolgt die Zellernte nach 4 Tagen ohne Mediumswechsel. Bei dieser Passage werden die adhärennten Zellen ihrer Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend dicht ausgesät, so dass nach 4 Tagen eine Konfluenz von 90% erreicht wird. Zur Zellernte werden adhärennte Zellen nach dem Absaugen des Mediums zunächst dreimal mit je 15 ml DPBS gewaschen und erst dann mit 15 ml Trypsin abgelöst. Das Medium wird zur späteren Analytik in einem Greinerröhrchen bei -20 °C gelagert. Nach Zugabe von 1,5 ml 10x Trypsininhibitor zu den Zellen werden die Zellen abzentrifugiert und zur Zellzahlbestimmung in 2 ml DPBS resuspendiert. Das Trypsinat wird zur späteren GAG-Analytik in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt und mit 4 Volumina 99% vergälltem Ethanol versetzt.

Bei Suspensionszellen erfolgt zur Zellernte eine Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml Greinerröhrchen mit anschließender Zentrifugation. Nach Abnahme des Mediums werden die Zellen dreimal in je 40 ml DPBS gewaschen bzw. resuspendiert und für 5 min bei 1000 g

zentrifugiert. Das abgenommene Medium wird zur späteren Analytik bei -20 °C gelagert. Zur Zellzahlbestimmung werden die Suspensionszellen in 2 ml DPBS resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit einer Neubauer Zählkammer. Zunächst wird ein Aliquot der Probe entsprechend der zu erwartenden Zellzahl in DPBS verdünnt und 1:1 mit einer Trypanblau-Lösung vermengt. 20 µl der Verdünnung werden in die Neubauer Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop gezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl werden 2 mal vier Großquadrate ausgezählt. Aus der Durchschnittszellzahl für ein Großquadrat multipliziert mit der Verdünnung und geteilt durch das Kammervolumen von 10^{-4} ml errechnet sich die Zellzahl je ml. Die Zellsuspensionen werden mit 4 Volumina 99% vergälltem Ethanol versetzt und bei -20 °C bis zur Glykosaminoglykan-Extraktion gelagert.

5.4.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur Einlagerung von Zelllinien erfolgt eine Kryokonservierung von frisch kultivierten Zellen. Die Zellen werden in der Petrischale bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Nach Ablösung mit einer Trypsin/EDTA-Lösung werden sie in kaltem Medium ohne Antibiotikum und FCS resuspendiert und dabei auf die vom Hersteller vorgegebene Zellzahl eingestellt. Nach Vermischung von 0,5 ml Zellsuspension mit 0,5 ml eines vorgekühlten Kryomediums (FCS mit 10% DMSO) im Kryoröhrchen werden die Zellen in einem Styroporblock über Nacht bei -80 °C eingefroren und anschließend in den Stickstofftank überführt.

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 Aufreinigung von DNA aus Vollblut

DNA wurde aus den Blutproben von 223 Blutspendern mit einem Durchschnittsalter von 40 ± 11 Jahren (Mittelwert \pm Mittelabweichung (SEM)) isoliert. Darunter waren 135 männliche und 88 weibliche Blutspender. Alle Blutspender gaben ihr Einverständnis für die Studie. Die Aufreinigung genomischer DNA erfolgte mit dem NucleoSpin Blood Kit. Dabei wird eine Probe von 200 µl Vollblut in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert, in welchem 25 µl einer Proteinase K Lösung und 200 µl des Lysemixes B3 vorgelegt werden. Nach 10 s Vortexen zur Durchmischung werden die Proben für nicht länger als 10 min bei 70 °C durch einen enzymatischen Verdau in Gegenwart von chaotropischen Ionen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 210 µl Ethanol wird die Probe durchmischt und auf eine Säule gegeben. Die Säule enthält eine Silikatmembran, die an DNA in ethanolhaltiger Lösung bindet. Nach

Zentrifugation für 1 min bei 11 000 g wird der Durchfluss verworfen und es folgen zwei Waschschrte mit je 500 µl eines ethanolhaltigen Puffers. Durch eine weitere Zentrifugation wird die Säule von restlichem Puffer und Ethanol bereit, bevor die Elution mit dem auf 70 °C vorgewärmten Tris-HCl Elutionspuffer BE erfolgt. Dabei werden 100 µl Puffer auf die Säule gegeben und die DNA nach 1 min Inkubation mittels Zentrifugation für 1 min bei 11 000 g eluiert. Alternativ kann die Elution auch mit 100 µl 70 °C heißem HPLC-Wasser durchgeführt werden. Die DNA-Lösung hat eine Konzentration von 4-6 µg DNA je 100 µl und kann stabil bei -20 °C gelagert werden.

5.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Bestimmung der Konzentration und Qualität einer DNA-Lösung erfolgt im Photometer bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Nukleinsäuren absorbieren das Licht über ihre aromatischen Ringe bei 260 nm, während Proteine ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm haben. Über den Absorptionsquotienten der Messwerte bei 260 nm und 280 nm lässt sich der Grad der Verunreinigung mit Proteinen bestimmen. Eine OD-Einheit bei 260 nm entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die photometrische Messung erfolgt mit einer 1 zu 5 verdünnten DNA-Lösung in einer Quarzküvette und destilliertem Wasser als Referenz.

5.5.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation gezielter DNA-Abschnitte durch die Auswahl geeigneter sequenzspezifischer *Primer* [107]. In einem zyklischen Prozess verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Abschnitte theoretisch mit jedem Zyklus. Durch diese exponentielle Amplifikation wird der Nachweis kleinster DNA-Mengen ermöglicht. Ein Zyklus von drei Grundschrten wird dabei 30-40 mal durchgeführt:

- 1) Denaturierung der doppelsträngigen DNA
- 2) *Annealing* der *Primer* an die einzelsträngige Matrize
- 3) Elongation durch eine thermostabile DNA-Polymerase

Bei der Auswahl der *Primer* wird eine *Primerlänge* von 17 bis 28 Nukleotiden gewählt. Die beiden *Primer* sollten einen möglichst ähnlichen Schmelzpunkt zwischen 55 °C und 80 °C haben und keine Dimere miteinander ausbilden können.

Ein typischer Reaktionsansatz (25 µl) zur Amplifikation von DNA-Bereichen ist wie folgt zusammengesetzt:

<i>Template</i> -DNA	5,0 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
<i>Primer</i> 1 (25 µM)	0,25 µl
<i>Primer</i> 2 (25 µM)	0,25 µl
dNTP-Mix (25 mM)	0,25 µl
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	0,3 µl
<i>Aqua dest.</i>	13,95 µl

Bei der Amplifikation des DNA-Fragmentes *XYLT1* Exon 1 ist der Zusatz von 5 µl 5 M Betain je Ansatz erforderlich.

Zunächst wird ohne *Template* ein Master-Mix erstellt, von welchem je 20 µl in die Vertiefungen einer 96-*well* Platte pipettiert werden. Dann werden je Vertiefung 5 µl der zu amplifizierenden DNA-Proben sowie je eine Negativ- und eine Positivkontrolle zugegeben. Für die PCR wird folgendes Standardprogramm verwendet:

Tab. 5.2 Standardprogramm für eine PCR-Reaktion.

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Start	15 min	95 °C	1
Denaturierung	1 min	94 °C	35
Annealing	1 min	50 °C bis 70 °C	
Elongation	1 min	72 °C	
Terminale Elongation	10 min	72 °C	1
Kühlen	∞	4 °C	1

Wenn die *Annealing*-Temperatur für eine neue Primer Konzentration noch nicht bekannt ist, wird der Ansatz gleichzeitig bei verschiedenen Temperaturen zwischen 50 °C und 70 °C durchgeführt. Anhand einer optimalen Produktbande wird das Temperaturoptimum für die *Annealing*-Temperatur bestimmt.

Folgende Annealingtemperaturen wurden mit den Primern aus Tab. 6.1 für die Amplifizierung eingesetzt:

Tab. 5.3 PCR-Bedingungen zur Amplifikation ausgewählter Exons.

Exon	Annealing-Temperatur [°C]	Größe des PCR-Produktes [bp]
<i>XYLT1</i> Exon 1	62,5	445
<i>XYLT2</i> Exon 2	56	399
<i>XYLT2</i> Exon 6	61	353

5.5.4 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Größenbestimmung und semiquantitativen Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern durch das Agarosegel in Richtung der Anode. Das Trennprinzip beruht darauf, dass kleine DNA-Fragmente die Agarosematrix schneller bzw. ungehinderter durchlaufen als größere DNA-Fragmente. Die Mobilität ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Je nach der Größe der zu trennenden Fragmente und der Längendifferenz zwischen verschiedenen Fragmenten werden Agarosegele mit Konzentrationen von 1 % bis 3 % eingesetzt. Generell wird bei kleinen Fragmenten und/oder geringen Größenunterschieden zwischen zu trennenden Fragmenten ein höherprozentiges Agarosegel eingesetzt.

Tab. 5.4 Agarosekonzentration in Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente.

Agarosekonzentration	Größe der DNA-Fragmente
0,5%	1-30 kb
1,0%	0,5-10 kb
1,5%	0,2-3 kb
2,0%	0,05-2 kb

Die Agarose wird in TBE-Puffer in einem Weithals-Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgeköcht und dabei gelöst. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) wird der Ansatz in eine Gelkammer mit eingesetztem Probenkamm gegossen. Nach der Polymerisation des

Gels wird der Probenkamm herausgezogen und die Gelkammer in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gelegt. Die DNA-Proben werden mit etwa 20% Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Zur späteren Längenbestimmung der DNA-Fragmente werden die beiden äußersten Geltaschen mit je 5 µl eines Längenstandards befüllt. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 120 V für 30 min bis 50 min durchgeführt. Danach wird die Gelkammer aus der Elektrophorese-Apparatur entnommen und das Gel wird auf einen UV-Transilluminator gelegt. Aufgrund des in die DNA interkalierenden Ethidiumbromides ergibt sich eine sichtbare Fluoreszenz (Extinktion: 302 nm, Emission: 590 nm) auf der Höhe der DNA-Banden im Gel.

Tab. 5.5 DNA-Längenstandards mit zugehörigen Fragmentgrößen.

DNA-Längenstandard	Fragmentgrößen [bp]
pUC19/ <i>Msp</i> I	501/489, 404, 331, 242, 190, 147, 111/110, 67
1-kb-Leiter	12216, 11198, 10180, 9132, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517, 506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75

5.5.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach dem Ausschneiden der gewünschten DNA-Bande aus dem Agarosegel erfolgt die Extraktion der DNA mit dem QIAEX II *Agarose Gel Extraction Kit*. Das Aufreinigungsprinzip beruht auf der reversiblen Bindung der DNA an eine Silikatmatrix unter Verwendung von Puffern mit hohen Salzkonzentrationen. Die Elution der DNA erfolgt dann mit einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration oder Wasser.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgen bei 13 000 g. Die ausgeschnittene Gelbande wird in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mit dem dreifachen Volumen an Puffer QX1 und 30 µl QIAX II versetzt, gevortext und 10 min bei 50 °C unter regelmäßigem Vortexen (alle 2 min) inkubiert. Nachdem sich das Gel aufgelöst hat und die DNA an die QIAEX II Partikel gebunden ist, erfolgt eine Zentrifugation für 30 s. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und die Partikel werden 2 mal in je 500 µl Puffer PE gewaschen, wobei die Probe resuspendiert und wiederum für 30 s abzentrifugiert wird. Das Probenpellet wird für 10-15 min an der Luft getrocknet, bis es eine weiße Farbe annimmt. Zur Elution wird das Pellet in 20 µl 10 mM Tris-HCl oder Wasser resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und für

30 s zentrifugiert. Der Überstand mit der aufgereinigten DNA wird in ein sauberes Gefäß überführt.

5.5.6 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Sequenzierung wird nach der Didesoxymethode nach Sanger [108] mit dem *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* durchgeführt. Im Sequenzieransatz liegen neben 2'-Desoxynukleotiden auch mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) vor. Wenn ein ddNTP durch die Polymerase eingebaut wird, erfolgt ein Kettenabbruch, da für eine weitere Elongation keine freie Hydroxylgruppe vorhanden ist. Dadurch ergibt sich ein Gemisch verschieden langer DNA-Fragmente, die an ihren Enden entsprechend dem eingebauten ddNTP einen von vier Fluoreszenzfarbstoffen zur späteren Detektion aufweisen. Bei Verwendung von PCR-Produkten zur Sequenzierung erfolgt zunächst eine Aufreinigung mit der *ExoSAP*-Reaktion.

Ansatz für die Aufreinigung je Amplifikat:

PCR-Amplifikat	5 µl
<i>Exonuklease I</i> WS (1U/µl)	1 µl
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	1 µl

Die Reaktion erfolgt im Thermocycler ohne Deckelheizung für 30 min bei 37 °C, gefolgt von 15 min bei 80 °C zur Inaktivierung der Enzyme.

Nach der Aufreinigung erfolgt die Sequenzierreaktion mit folgendem 20 µl Standardansatz:

Aufgereinigtes PCR-Produkt	3,0 - 7,0 µl
<i>BigDye</i> Sequenzierpuffer (5x)	4,0 µl
<i>Forward-</i> oder <i>Reverse-Primer</i> (2,5 µM)	1,5 µl
<i>BigDye</i> Premix	2,0 µl
HPLC-Wasser	add. 20,0 µl

Für die Sequenzierreaktion wird folgendes Programm verwendet:

Tab. 5.6 Allgemeines Programm der Sequenzierreaktion.

Programmschritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Start	2 min	95 °C	1
Denaturierung	10 s	95 °C	25
Annealing	10 s	50 °C bis 70 °C	
Elongation	4 min	60 °C	
Kühlen	∞	4 °C	1

Das Produkt der Sequenzierreaktion wird vor der Analyse aufgereinigt. Dazu werden 800 µl einer Sephadex G-50 *Superfine* Agarose Suspension in TE-Puffer in eine *NucleoSpin*-Säule pipettiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 1000 g wird der Durchfluss verworfen und das Sequenzierprodukt mittig auf die Agarosematrix gegeben. Nach Zentrifugation für 4 min bei 1000 g wird das Sequenzierprodukt in ein 500 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 20 µl HPLC-Wasser verdünnt. Nach 2 min Denaturierung bei 94°C kann der Ansatz für die Analyse eingesetzt werden.

Die kapillargelelektrophoretische Trennung mit Fluoreszenz-Detektion der DNA-Fragmente wird an dem Sequenzer *ABI Prism 310* der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Folgende Parameter werden für die kapillargelelektrophoretische Trennung gewählt:

Tab. 5.7 Programm zur Analyse eines Sequenzierproduktes.

Modul	Injektionszeit	Injektionsspannung	Elektrophorese-		
			Spannung	Temperatur	Zeit
SeqPOP6 Rapid	20 s	6 kV	15 kV	50 °C	36-45 min

5.5.7 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die kurze DNA-Sequenzen erkennen und daraufhin die doppelsträngige DNA durch die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen spalten. Für die Restriktion von DNA werden die Typ-II-Restriktionsendonukleasen eingesetzt, da sie die DNA im Bereich der Erkennungssequenz, welche meist 4 bis 8 Basenpaare umfasst, schneiden. Die Effizienz der Spaltung ist abhängig von den Reaktionsbedingungen und für

jedes Restriktionsenzym unterschiedlich. Restriktionsendonukleasen werden für die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus(RFLP)-Analyse eingesetzt um DNA-Proben gezielt auf Polymorphismen zu untersuchen. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass genetische Variationen im Vergleich zur Wildtyp-DNA die Restriktionsschnittstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym aufweisen bzw. nicht aufweisen. Wenn man DNA-Proben auf einen Polymorphismus untersuchen will, erfolgt zunächst die Auswahl eines geeigneten Restriktionsenzym, dessen Erkennen einer Schnittstelle durch die genetische Variation beeinflusst wird. Nach Restriktionsbehandlung der Proben und einer Positiv- und einer Negativkontrolle kann man die Proben über die Agarosegelelektrophorese auftrennen. Das jeweilige Bandenmuster ergibt Aufschluss darüber, ob eine Probe den untersuchten Polymorphismus in heterozygoter oder homozygoter Form aufweist oder dem Wildtyp entspricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RFLP-Analyse zur Untersuchung von *XYLT*-Variationen eingesetzt. Die Restriktionsenzyme wurden entsprechend den Vorgaben der Hersteller eingesetzt.

Komposition eines Restriktionsverdaues:

PCR-Produkt	5,0 µl
Reaktionspuffer (10x)	1,0 µl
Restriktionsenzym	1 IU
Wasser (Aqua ad iniectabilia)	ad 10 µl

Zunächst wird ohne *Template* ein Master-Mix erstellt, von welchem je 5 µl in die Vertiefungen einer 96-*well* Platte pipettiert werden. Dann werden je 5 µl der zu untersuchenden DNA-Proben sowie eine Negativ- und eine Positivkontrolle zugegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur. Das Restriktionsprodukt wird mit 2 µl Auftragspuffer gemischt und in einem 1,5 bis 3%igen Agarosegel aufgetrennt. Folgende Restriktionsenzyme wurden für die RFLP-Analyse eingesetzt (Tab. 5.8):

Tab. 5.8 Übersicht über die eingesetzten Restriktionsenzyme und die Zuordnung der RFLP-Fragmente zum Genotyp.

SNP	Restriktions- enzym	Genotyp und Fragmentgrößen [bp]		
		Wildtyp	heterozygot	homozygot
<i>XYLT1</i> Exon 1 c.343G>T; p.A115S	<i>NmuCI</i>	445	445, 379, 66	379, 66
<i>XYLT2</i> Exon 2 c.166G>A; p.D56N	<i>Eco47I</i>	152, 159, 88	247, 152, 159, 88	247, 152
<i>XYLT2</i> Exon 6 c.1253C>T; p.P418L	<i>FauI</i>	229, 123	353, 229, 123	353

5.6 Statistik

Die Verteilung der Allele zu jedem untersuchten SNP wurden auf die Einhaltung des Hardy-Weinberg Gleichgewichtes getestet. Alle weiteren statistischen Auswertungen wurden mit der GraphPad Prism 4 Software durchgeführt. Die Daten wurden mit dem *unpaired Student's t* Test ausgewertet. Beim Vergleich von mehreren Datengruppen, welche der gleichen Kategorie zuzuordnen waren, wurde die Analyse mittels *one-way ANOVA* und *Dunnett's post* Test durchgeführt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

6. Material und Geräte

6.1 Zelllinien

1301	(T-Zell Leukämie)	ECACC 01051619	Wiltshire, UK
A-431	(epidermoides Karzinom)	ACC 91	DSMZ, Braunschweig
A-549	(Lungenkarzinom)	ACC 107	DSMZ, Braunschweig
BM-1604	(Prostatakarzinom)	ACC 298	DSMZ, Braunschweig
CAPAN-1	(Pankreas-Adenokarzinom)	ACC 244	DSMZ, Braunschweig
CAPAN-2	(Pankreas-Adenokarzinom)	ACC 245	DSMZ, Braunschweig
Chang Liver	(Gebärmutterhalskrebs)	ECACC 88021102	Wiltshire, UK
EA.hy926	(hybrides Endothel)	ATCC CRL-2922	ATCC, Rockville, USA
HEK-293	(embryonale Niere)	ACC 305	DSMZ, Braunschweig
Hs27	(Dermalfibroblast)	ATCC CRL-1634	ATCC, Rockville, USA
HT-1080	(epitheliales Fibrosarkom)	ATCC CCL-121	ATCC, Rockville, USA
HT-29	(Dickdarmadenokarzinom)	ACC 299	DSMZ, Braunschweig
hTERT-BJ1	(immortalisierte Fibroblasten)	C4001-1	Clontech, Mountain View, CA, USA
K-562	(chronische, myeloische Leukämie)	ACC 10	DSMZ, Braunschweig
LNCAP	(Prostatakarzinom)	ACC 356	DSMZ, Braunschweig
MHH-ES-1	(Ewing's Osteosarkom)	ACC 167	DSMZ, Braunschweig
SAOS-2	(Osteosarkom)	ACC 342	DSMZ, Braunschweig
SW 1353	(Chondrosarkom)	ATCC HTB-94	ATCC, Rockville, USA
SW 982	(Synoviales Sarkom)	ATCC HTB-93	ATCC, Rockville, USA
THP-1	(akute monocytische Leukämie)	ATCC TIB-202	ATCC, Rockville, USA
WERI-RB-1	(Retinoblastom)	ACC 90	DSMZ, Braunschweig
Y-79	(Retinoblastom)	ACC 246	DSMZ, Braunschweig

6.2 Zellkulturmedien, -lösungen und -reagenzien

Antibiotika-Lösung (100x)	Sigma, Taufkirchen
Amphotericin B (25 µg/mL)	
Penicillin (10 U/µL)	
Streptomycin (10 mg/mL)	
DMEM (1 x High Glukose)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DPBS (9,5 mM)	Cambrex, Verviers, Belgien
Fötale Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuailé, Frankreich
L-Glutamin (100 x) (29,3 mg/mL)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI 1640	Cambrex, Verviers, Belgien
Trypsin-EDTA-Lösung (10 x)	Cambrex, Verviers, Belgien

6.3 Reagenzien, Enzyme, Antikörper

Acetonitril, HPLC-Gradient Grade	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Merck, Darmstadt
2-Aminoacridon (AMAC)	Fluka, Schnelldorf
Ammoniumacetat	Fluka, Schnelldorf
Betain	Sigma, Taufkirchen
Calciumacetat	Fluka, Schnelldorf
Chondroitinase ABC	Sigma, Taufkirchen
Chondroitinsulfat A, B und C	Sigma, Taufkirchen
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs, 100 mM)	Promega, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma, Taufkirchen
DNA-Marker pUC19/ <i>Msp</i> I	MBLL, Bielefeld
Glykosaminoglykan Δ-Disaccharide	MoBiTec, Göttingen
Eisessig	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (500 µg/mL)	Sigma, Taufkirchen
<i>Exonuclease</i> I (20 000 U/mL)	New England BioLabs, Frankfurt
Ficolllösung	Biotest (Dreieich, Germany)

Heparansulfatlösung	Sigma, Taufkirchen
Heparinasen 1, 2 und 3	Grampian enzymes (Orkney, UK)
Hepes	Sigma, Taufkirchen
<i>HotStar-Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Serva, Heidelberg
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
MES	Sigma, Taufkirchen
Mineralöl	Sigma, Taufkirchen
Natriumborhydrid	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumcyanoborhydrid (purum)	Fluka, Schnelldorf
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Oligo dT-Primer	Invitrogen, Groningen, NL
Percoll	Sigma, Taufkirchen
Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer	MBI Fermentas, St.Leon-Rot New England BioLabs, Beverly, USA
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Seide (unbehandelt)	Idee, Bielefeld
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> (1 U/μL)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Szintillationsflüssigkeit	Beckmann Coulter, CA, USA
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Trichloressigsäure	Sigma, Taufkirchen
Triethylammoniumacetat (TEAA)	Transgenomic, Berlin
Tris	Roth, Karlsruhe
UDP-[¹⁴ C]Xylose	NEN / Perkin Elmer, Boston, USA

Wasser:

Rotisolv HPLC-Gradient-Grade	Roth, Karlsruhe
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun, Melsungen
Aqua B. Braun	Braun, Melsungen

6.4 Reagenziensätze

<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>	ABI, Foster City, USA
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>MN NucleoSpin Blood Kit</i>	Macherey-Nagel, Düren

6.5 Software

<i>NEBcutter</i>	http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html
<i>Sequence Analysis 3.7</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
Prism 4.00 GraphPad Software	San Diego, CA, USA
Shimadzu LC solution postrun analysis	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan

6.6 Sonstige Materialien

Neubauerzählkammer	Fleischhacker, Meckenheim
Nitrocellulosemembranen	Sartorius, Göttingen
Vivaspin 0,5 mL <i>Concentrator</i> (3000 MWCO PES)	Vivascience, Hannover
HPLC-Säule Waters X-Bridge Shield (3,5 µm, 100 mm x 4,6 mm I.D.)	Waters Corporation, Milford, MA, USA

Es wurden sterile Einwegreaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Zellkulturflaschen, Schalen, Zentrifugenröhrchen und Glasgeräte der Firmen ABgene, Becton Dickinson, Falcon, Sarstedt, Sartorius und Schott verwendet.

6.7 Puffer und Lösungen

Auftragspuffer für Nukleinsäuren	0,05% Xylencyanol, 0,05% Bromphenolblau
	60% Saccharose in dest. Wasser
Chondroitinase ABC-Puffer, pH 8	50 mM Ammoniumacetat
Heparinase-Puffer, pH 7,1	20 mM Ammoniumacetat, 4 mM Calciumacetat
Hepes-Puffer, pH 7,4	20 mM Hepes, 0,85% NaCl, 1 mM EDTA,

HPLC-Puffer, pH 5,6	60 mM Ammoniumacetat
PBS, pH 7,2	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ in dest. Wasser
Substratreagenz (XT-Test)	1 µM UDP-[¹⁴ C]Xylose; 0,6 % solvatisiertes Seidenfibroin; 50 mM KCl; 10 mM KF; 10 mM MnCl ₂ ; 10 mM MgCl ₂ ; 50 mM 4-Morpholinoethansulfonsäure-HCl (MES), pH 6,5
TE-Puffer, pH 7,5	10 mM Tris, 1 mM EDTA in dest. Wasser
Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10 x)	Invitrogen, Groningen, NL

6.8 Geräte

ABI Prism 310 <i>Genetic Analyzer</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
ABI Prism 7200 <i>Sequence Detector</i>	Perkin Elmer, Foster City, USA
Architect ci8200	Abbott Diagnostics, Wiesbaden
Autoklav	Tecnorama, Fernwald
Automatikpipetten	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank für Zellkultur	Tritec, Hannover
CellDyn 4000	Abbott Diagnostics, Wiesbaden
Elektrophoresekammern	Pharmacia, Freiburg, AGS, Heidelberg
HPLC (Shimadzu Prominence LC-20A)	Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan
HPLC (Waters Alliance 2795)	Waters Corporation, Milford, MA, USA
ESI-MS	Waters Corporation, Milford, MA, USA
Mikroskop, Nikon Eclipse TE2000-S	Nikon, Düsseldorf
Spannungsgerät PS 3002	Gibco BRL, Eggenstein
Spannungsgerät PS 500	Renner, Darmstadt
Sterilbank Variolab W 90 (Klasse II)	Waldner, Wangen
Szintillationszähler Tri-Carb 2800 TR	Perkin Elmer, Foster City, USA
Tgradient ThermoCycler	Biometra, Göttingen
Thermocycler	Landgraf Laborgeräte, Langenhagen
UV-Illuminator	Renner, Darmstadt
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg

6.9 Oligonukleotide (*Primer*)

Die in dieser Arbeit verwendeten *Primer* wurden von den Firmen Invitrogen (Groningen, NL) und Biomers (Ulm) bezogen.

Tab. 6.1: Für die RFLP-Analytik zur Amplifizierung und Sequenzierung eingesetzte Primer.

Exon	<i>Primer</i> -Sequenz (5' - 3')	<i>Annealing</i> -Temp. [°C]	PCR-Produkt [bp]
XYLT1, Exon 1	Forward: GGG TCC CCG CGC CTC G Reverse: CCT CCC TCC CTC GCC GC	62,5	445
XYLT2, Exon 2	Forward: CAA GGA ACA GGA GGA GGT Reverse: GTG AAG CCA TTG TCC GTG	56	399
XYLT2, Exon 6	Forward: AAA GAG CTT AGA CCC CAC Reverse: GCA AGG GAG AGT GGA AGG	61	353

7 Abkürzungen

7.1 Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

7.2 Abkürzungen für Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

7.3 Sonstige Abkürzungen

a	Atto (10^{-18})
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AMAC	2-Aminoacridon
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel (radioaktive Zerfälle pro Sekunde)
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration
c.	cDNA-Sequenz
^{14}C	Kohlenstoff-Isotop
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium

cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CS	Chondroitinsulfat
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpm	radioaktive Zerfälle pro Minute
DS	Dermatansulfat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronenspray-Ionisation
f	Femto (10 ⁻¹⁵)
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
g	Gramm
GAG(s)	Glykosaminoglykan(e)
Gal	Galaktose
GlcA	Glucuronsäure
h	Stunde
H	Heparin
HA	Hyaluronsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hm	homozygot
HS	Heparansulfat
ht	heterozygot
I.D.	Innendurchmesser
I.U.	<i>International Unit</i> (Enzymmenge, die 1 µmol/min Substrat umsetzt)
k	Kilo (10 ³)

KS	Keratansulfat
l	Liter
LIF-CE	<i>laser induced fluorescence - capillary electrophoresis</i>
m	Meter
m	Milli (10^{-3})
M	mol/Liter
MES	2-(N-morpholin)-ethansulfonsäure
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
O.D.	Extinktion (optische Dichte)
p	Pico (10^{-12})
p.	Proteinsequenz
p.A.	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PES	Polyethersulfon
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
PG(s)	Proteoglykan(e)
PRP	plättchenreiches Plasma
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PXE	Pseudoxanthoma elasticum
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RP-HPLC	<i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Mittelabweichung (<i>standard error of the mean</i>)

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TEAA	Triethylammoniumacetat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus
wt	Wildtyp
XT	Xylosyltransferase (Enzym)
Xyl	Xylose
<i>XYLT</i>	Xylosyltransferase (Gen)
ZKÜ	Zellkulturüberstand

8 Literatur

- [1] Kolset, S. O., Prydz, K., Pejler, G., Intracellular proteoglycans. *Biochem J* **379** (2004), 217-227.
- [2] Vynios, D. H., Karamanos, N. K., Tsiganos, C. P., Advances in analysis of glycosaminoglycans: its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. *J Chromatogr B* **781** (2002), 21-38.
- [3] Tkachenko, E., Rhodes, J. M., Simons, M., Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* **96** (2005), 488-500.
- [4] Filmus, J., Selleck, S. B., Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* **108** (2001), 497-501.
- [5] Kiani, C., Chen, L., Wu, Y. J., Yee, A. J., Yang, B. B., Structure and function of aggrecan. *Cell Res* **12** (2002), 19-32.
- [6] Jiang, X., Couchman, J. R., Perlecan and tumor angiogenesis. *J Histochem Cytochem* **51** (2003), 1393-1410.
- [7] Nelimarkka, L., Kainulainen, V., Schönherr, E., Moisander, S., Jortikka, M., Lammi, M., Elenius, K., Jalkanen, M., Jarvelainen, H., Expression of small extracellular chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans is differentially regulated in human endothelial cells. *J Biol Chem* **272** (1997), 12730-12737.
- [8] Mathiak, M., Yenisey, C., Grant, D. S., Sharma, B., Iozzo, R. V., A role for perlecan in the suppression of growth and invasion in fibrosarcoma cells. *Cancer Res* **57** (1997), 2130-2136.
- [9] Datta, M. W., Hernandez, A. M., Schlicht, M. J., Kahler, A. J., DeGueme, A. M., Dhir, R., Shah, R. B., Farach-Carson, C., Barrett, A., Datta, S., Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth via the Sonic Hedgehog pathway. *Mol Cancer* **5** (2006), 1-15.
- [10] Rostand, K. S., Esko, J. D., Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* **65** (1997), 1-8.
- [11] Fallgren, C., Andersson, A., Ljungh, A., The role of glycosaminoglycan binding of staphylococci in attachment to eukaryotic host cells. *Curr Microbiol* **43** (2001), 57-63.
- [12] Militopoulou, M., Lamari, F. N., Hjerpe, A., Karamanos, N. K., Determination of twelve heparin- and heparan sulfate-derived disaccharides as 2-aminoacridone derivatives by capillary zone electrophoresis using ultraviolet and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **23** (2002), 1104-1109.
- [13] Kjellen, L., Lindahl, U., Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* **60** (1991), 443-475.
- [14] Fraser, J. R., Laurent, T. C., Laurent, U. B., Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* **242** (1997), 27-33.

-
- [15] Evanko, S. P., Tammi, M. I., Tammi, R. H., Wight, T. N., Hyaluronan-dependent pericellular matrix. *Adv Drug Deliv Rev* **59** (2007), 1351-1365.
- [16] Lamari, F. N., Theocharis, A. D., Asimakopoulou, A. P., Malavaki, C. J., Karamanos, N. K., Metabolism and biochemical/physiological roles of chondroitin sulfates: analysis of endogenous and supplemental chondroitin sulfates in blood circulation. *Biomed Chromatogr* **20** (2006), 539-550.
- [17] Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J. P., Lindahl, U., Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol* **174** (2006), 323-327.
- [18] Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., Zako, M., Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* **68** (1999), 729-777.
- [19] Esko, J. D., Lindahl, U., Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* **108** (2001), 169-173.
- [20] Funderburgh, J. L., Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* **10** (2000), 951-958.
- [21] Volpi, N., Advances in chondroitin sulfate analysis: application in physiological and pathological States of connective tissue and during pharmacological treatment of osteoarthritis. *Curr Pharm Des* **12** (2006), 639-658.
- [22] Itano, N., Kimata, K., Altered hyaluronan biosynthesis in cancer progression. *Semin Cancer Biol* **18** (2008), 268-274.
- [23] Komosinska-Vassev, K., Olczyk, K., Kozma, E. M., Olczyk, P., Wisowski, G., Winsz-Szczotka, K., Alterations of glycosaminoglycan metabolism in the development of diabetic complications in relation to metabolic control. *Clin Chem Lab Med* **43** (2005), 924-929.
- [24] Komosinska-Vassev, K., Winsz-Szczotka, K., Olczyk, K., Kozma, E. M., Alterations in serum glycosaminoglycan profiles in Graves' patients. *Clin Chem Lab Med* **44** (2006), 582-588.
- [25] Wilkinson, D. R., Erickson, A. D., Urinary and Serologic Markers for Interstitial Cystitis: An Update. *Curr Urol Rep* **7** (2006), 414-422.
- [26] Belo, J. N., Berger, M. Y., Reijman, M., Koes, B. W., Bierma-Zeinstra, S. M., Prognostic factors of progression of osteoarthritis of the knee: a systematic review of observational studies. *Arthritis Rheum* **57** (2007), 13-26.
- [27] Kozma, E. M., Olczyk, K., Glowacki, A., Komosinska, K., Sonecki, P., Najmiec, T., Jazwiec, M., Glycosaminoglycans of human serum and their alterations in diabetes mellitus. *Acta Biochim Pol* **43** (1996), 567-574.
- [28] Kahaly, G., Hansen, C., Otto, E., Forster, G., Beyer, J., Hommel, G., Diabetic microangiopathy and urinary glycosaminoglycans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **105** (1997), 145-151.

-
- [29] Edward, M., Gillan, C., Micha, D., Tammi, R. H., Tumour regulation of fibroblast hyaluronan expression: a mechanism to facilitate tumour growth and invasion. *Carcinogenesis* **26** (2005), 1215-1223.
- [30] Mroz, P. J., Silbert, J. E., Effects of [3H]glucosamine concentration on [3H]chondroitin sulphate formation by cultured chondrocytes. *Biochem J* **376** (2003), 511-515.
- [31] Yeo, T. K., Nagy, J. A., Yeo, K. T., Dvorak, H. F., Toole, B. P., Increased hyaluronan at sites of attachment to mesentery by CD44-positive mouse ovarian and breast tumor cells. *Am J Pathol* **148** (1996), 1733-1740.
- [32] Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Handbook of Glycosyltransferase and Related Genes. Springer, Tokyo (2002).
- [33] Breton, C., Snajdrova, L., Jeanneau, C., Koca, J., Imberty, A., Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* **16** (2006), 29R-37R.
- [34] Kapitonov, D., Yu, R. K., Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* **9** (1999), 961-978.
- [35] Unligil, U. M., Rini, J. M., Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **10** (2000), 510-517.
- [36] Paulson, J. C., Colley, K. J., Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* **264** (1989), 17615-17618.
- [37] Yamamoto, F., Clausen, H., White, T., Marken, J., Hakomori, S., Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature* **345** (1990), 229-233.
- [38] Breton, C., Imberty, A., Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* **9** (1999), 563-571.
- [39] Chiu, C. P., Watts, A. G., Lairson, L. L., Gilbert, M., Lim, D., Wakarchuk, W. W., Withers, S. G., Strynadka, N. C., Structural analysis of the sialyltransferase CstII from *Campylobacter jejuni* in complex with a substrate analog. *Nat Struct Mol Biol* **11** (2004), 163-170.
- [40] Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Cloning and recombinant expression of active full-length xylosyltransferase I (XT-I) and characterization of subcellular localization of XT-I and XT-II. *J Biol Chem* **281** (2006), 14224-14231.
- [41] Götting, C., Müller, S., Schöttler, M., Schön, S., Prante, C., Brinkmann, T., Kuhn, J., Kleesiek, K., Analysis of the DXD motifs in human xylosyltransferase I required for enzyme activity. *J Biol Chem* **279** (2004), 42566-42573.
- [42] Schwartz, N. B., Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of beta-xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein. *J Biol Chem* **252** (1977), 6316-6321.

- [43] Kearns, A. E., Campbell, S. C., Westley, J., Schwartz, N. B., Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: a kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase. *Biochemistry* **30** (1991), 7477-7483.
- [44] Pönighaus, C., Ambrosius, M., Casanova, J. C., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J. D., Kleesiek, K., Götting, C., Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* **282** (2007), 5201-5206.
- [45] Brinkmann, T., Weilke, C., Kleesiek, K., Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *J Biol Chem* **272** (1997), 11171-11175.
- [46] Weilke, C., Brinkmann, T., Kleesiek, K., Determination of xylosyltransferase activity in serum with recombinant human bikunin as acceptor. *Clin Chem* **43** (1997), 45-51.
- [47] Kuhn, J., Prante, C., Schön, S., Götting, C., Kleesiek, K., Measurement of fibrosis marker xylosyltransferase I activity by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* **52** (2006), 2243-2249.
- [48] Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., Kleesiek, K., Xylosylation of alternatively spliced isoforms of Alzheimer APP by xylosyltransferase. *J Protein Chem* **17** (1998), 295-302.
- [49] Götting, C., Sollberg, S., Kuhn, J., Weilke, C., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., Kleesiek, K., Serum xylosyltransferase: a new biochemical marker of the sclerotic process in systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* **112** (1999), 919-924.
- [50] Götting, C., Kuhn, J., Sollberg, S., Huerkamp, C., Brinkmann, T., Krieg, T., Kleesiek, K., Elevated serum xylosyltransferase activity correlates with a high level of hyaluronate in patients with systemic sclerosis. *Acta Derm Venereol* **80** (2000), 60-61.
- [51] Götting, C., Kuhn, J., Tinneberg, H. R., Brinkmann, T., Kleesiek, K., High xylosyltransferase activities in human follicular fluid and cultured granulosa-lutein cells. *Mol Hum Reprod* **8** (2002), 1079-1086.
- [52] Götting, C., Kuhn, J., Brinkmann, T., Kleesiek, K., Xylosyltransferase activity in seminal plasma of infertile men. *Clin Chim Acta* **317** (2002), 199-202.
- [53] Götting, C., Hendig, D., Adam, A., Schön, S., Schulz, V., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Elevated xylosyltransferase I activities in pseudoxanthoma elasticum (PXE) patients as a marker of stimulated proteoglycan biosynthesis. *J Mol Med* **83** (2005), 984-992.
- [54] Schöttler, M., Müller, S., Schön, S., Prante, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Serum xylosyltransferase I activity, the new biochemical fibrosis marker, is not affected by renal insufficiency. *Clin Biochem* **38** (2005), 486-488.
- [55] Schön, S., Prante, C., Müller, S., Schöttler, M., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Impact of polymorphisms in the genes encoding xylosyltransferase I and a homologue in type 1 diabetic patients with and without nephropathy. *Kidney Int* **68** (2005), 1483-1490.

- [56] Bahr, C., Schön, S., Kuhn, J., Groop, P. H., Parkkonen, M., Wessman, M., Kleesiek, K., Götting, C., Novel sequence variants in the human xylosyltransferase I gene and their role in diabetic nephropathy. *Diabet Med* **23** (2006), 681-684.
- [57] Schön, S., Prante, C., Bahr, C., Tarnow, L., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., The xylosyltransferase I gene polymorphism c.343G>T (p.A125S) is a risk factor for diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* **29** (2006), 2295-2299.
- [58] Schön, S., Schulz, V., Prante, C., Hendig, D., Szliska, C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Polymorphisms in the xylosyltransferase genes cause higher serum XT-I activity in patients with pseudoxanthoma elasticum (PXE) and are involved in a severe disease course. *J Med Genet* **43** (2006), 745-749.
- [59] Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T., Kleesiek, K., Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J Mol Biol* **304** (2000), 517-528.
- [60] Kuhn, J., Götting, C., Schnölzer, M., Kempf, T., Brinkmann, T., Kleesiek, K., First isolation of human UDP-D-xylose: proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase secreted from cultured JAR choriocarcinoma cells. *J Biol Chem* **276** (2001), 4940-4947.
- [61] Kuhn, J., Mölle, K., Brinkmann, T., Götting, C., Kleesiek, K., High-density tissue-like cultivation of JAR choriocarcinoma cells for the in vitro production of human xylosyltransferase. *J Biotechnol* **103** (2003), 191-196.
- [62] Kuhn, J., Müller, S., Schnölzer, M., Kempf, T., Schön, S., Brinkmann, T., Schöttler, M., Götting, C., Kleesiek, K., High-level expression and purification of human xylosyltransferase I in High Five insect cells as biochemically active form. *Biochem Biophys Res Commun* **312** (2003), 537-544.
- [63] Wilson, I. B., The never-ending story of peptide O-xylosyltransferase. *Cell Mol Life Sci* **61** (2004), 794-809.
- [64] Cuellar, K., Chuong, H., Hubbell, S. M., Hinsdale, M. E., Biosynthesis of chondroitin and heparan sulfate in chinese hamster ovary cells depends on xylosyltransferase II. *J Biol Chem* **282** (2007), 5195-5200.
- [65] Voglmeir, J., Voglauer, R., Wilson, I. B., XT-II, the second isoform of human peptide-O-xylosyltransferase, displays enzymatic activity. *J Biol Chem* **282** (2007), 5984-5990.
- [66] Casanova, J. C., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Heterologous expression and biochemical characterization of soluble human xylosyltransferase II. *Biochem Biophys Res Commun* **365** (2008), 678-684.
- [67] Toyoda, H., Motoki, K., Tanikawa, M., Shinomiya, K., Akiyama, H., Imanari, T., Determination of human urinary hyaluronic acid, chondroitin sulphate and dermatan sulphate as their unsaturated disaccharides by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **565** (1991), 141-148.
- [68] Karamanos, N. K., Axelsson, S., Vanky, P., Tzanakakis, G. N., Hjerpe, A., Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-

- performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans. *J Chromatogr A* **696** (1995), 295-305.
- [69] Huang, Y., Washio, Y., Hara, M., Toyoda, H., Koshiishi, I., Toida, T., Imanari, T., Simultaneous determination of dermatan sulfate and oversulfated dermatan sulfate in plasma by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization. *Anal Biochem* **240** (1996), 227-234.
- [70] Karamanos, N. K., Vanky, P., Tzanakakis, G. N., Hjerpe, A., High performance capillary electrophoresis method to characterize heparin and heparan sulfate disaccharides. *Electrophoresis* **17** (1996), 391-395.
- [71] Karamanos, N. K., Vanky, P., Tzanakakis, G. N., Tsegenidis, T., Hjerpe, A., Ion-pair high-performance liquid chromatography for determining disaccharide composition in heparin and heparan sulphate. *J Chromatogr A* **765** (1997), 169-179.
- [72] Toyoda, H., Nagashima, T., Hirata, R., Toida, T., Imanari, T., Sensitive high-performance liquid chromatographic method with fluorometric detection for the determination of heparin and heparan sulfate in biological samples: application to human urinary heparan sulfate. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **704** (1997), 19-24.
- [73] Volpi, N., Hyaluronic acid and chondroitin sulfate unsaturated disaccharides analysis by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection with dansylhydrazine. *Anal Biochem* **277** (2000), 19-24.
- [74] Karamanos, N. K., Hjerpe, A., Disaccharide composition in glycosaminoglycans/proteoglycans analyzed by capillary zone electrophoresis. *Methods Mol Biol* **171** (2001), 181-192.
- [75] Oguma, T., Toyoda, H., Toida, T., Imanari, T., Analytical method for keratan sulfates by high-performance liquid chromatography/turbo-ionspray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* **290** (2001), 68-73.
- [76] Oguma, T., Toyoda, H., Toida, T., Imanari, T., Analytical method of heparan sulfates using high-performance liquid chromatography turbo-ionspray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **754** (2001), 153-159.
- [77] Oguma, T., Toyoda, H., Toida, T., Imanari, T., Analytical method of chondroitin/dermatan sulfates using high performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization mass spectrometry: application to analyses of the tumor tissue sections on glass slides. *Biomed Chromatogr* **15** (2001), 356-362.
- [78] Skidmore, M. A., Guimond, S. E., Dumax-Vorzet, A. F., Atrih, A., Yates, E. A., Turnbull, J. E., High sensitivity separation and detection of heparan sulfate disaccharides. *J Chromatogr A* **1135** (2006), 52-56.
- [79] Zinellu, A., Pisanu, S., Zinellu, E., Lepedda, A. J., Cherchi, G. M., Sotgia, S., Carru, C., Deiana, L., Formato, M., A novel LIF-CE method for the separation of hyaluronan- and chondroitin sulfate-derived disaccharides: Application to structural and quantitative analyses of human plasma low- and high-charged chondroitin sulfate isomers. *Electrophoresis* **28** (2007), 2439-2447.

-
- [80] Karousou, E. G., Porta, G., De Luca, G., Passi, A., Analysis of fluorophore-labelled hyaluronan and chondroitin sulfate disaccharides in biological samples. *J Pharm Biomed Anal* **34** (2004), 791-795.
- [81] Karousou, E. G., Militsopoulou, M., Porta, G., De Luca, G., Hascall, V. C., Passi, A., Polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labeled hyaluronan and chondroitin sulfate disaccharides: application to the analysis in cells and tissues. *Electrophoresis* **25** (2004), 2919-2925.
- [82] Kitagawa, H., Kinoshita, A., Sugahara, K., Microanalysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides labeled with the fluorophore 2-aminoacridone by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **232** (1995), 114-121.
- [83] Kinoshita, A., Sugahara, K., Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high-performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides. *Anal Biochem* **269** (1999), 367-378.
- [84] Lamari, F., Theocharis, A., Hjerpe, A., Karamanos, N. K., Ultrasensitive capillary electrophoresis of sulfated disaccharides in chondroitin/dermatan sulfates by laser-induced fluorescence after derivatization with 2-aminoacridone. *J Chromatogr B* **730** (1999), 129-133.
- [85] Lamari, F. N., Kuhn, R., Karamanos, N. K., Derivatization of carbohydrates for chromatographic, electrophoretic and mass spectrometric structure analysis. *J Chromatogr B* **793** (2003), 15-36.
- [86] Chandran, S., Singh, R. S., Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie* **62** (2007), 4-14.
- [87] Mocak, J., Bond, A. M., Mitchell, S., A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification. *Pure and Appl Chem* **69** (1997), 297-328.
- [88] Iozzo, R. V., Proteoglycan Protocols. *Methods in Molecular Biology* **171** (2001), 1-576.
- [89] Stoolmiller, A. C., Horwitz, A. L., Dorfman, A., Biosynthesis of the chondroitin sulfate proteoglycan. Purification and properties of xylosyltransferase. *J Biol Chem* **247** (1972), 3525-3532.
- [90] Schön, S., Huep, G., Prante, C., Müller, S., Christ, R., Hagen, F. W., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Mutational and functional analyses of xylosyltransferases and their implication in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* **14** (2006), 442-448.
- [91] Karamanos, N. K., Syrokou, A., Vanky, P., Nurminen, M., Hjerpe, A., Determination of 24 variously sulfated galactosaminoglycan- and hyaluronan-derived disaccharides by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* **221** (1994), 189-199.
- [92] Ambrosius, M., Kleesiek, K., Götting, C., Quantitative determination of the glycosaminoglycan Delta-disaccharide composition of serum, platelets and

- granulocytes by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* **1201** (2008), 54-60.
- [93] Deakin, J. A., Lyon, M., A simplified and sensitive fluorescent method for disaccharide analysis of both heparan sulfate and chondroitin/dermatan sulfates from biological samples. *Glycobiology* **18** (2008), 483-491.
- [94] Huang, Y., Toyoda, H., Toida, T., Imanari, T., Determination of chondroitin sulphates in human whole blood, plasma and blood cells by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* **9** (1995), 102-105.
- [95] Ford, T. C., Graham, J., Rickwood, D., A new, rapid, one-step method for the isolation of platelets from human blood. *Clin Chim Acta* **192** (1990), 115-119.
- [96] Donato, J. L., Marcondes, S., Antunes, E., Nogueira, M. D., Nader, H. B., Dietrich, C. P., Rendu, F., de Nucci, G., Role of chondroitin 4-sulphate as a receptor for polycation induced human platelet aggregation. *Br J Pharmacol* **119** (1996), 1447-1453.
- [97] Okayama, M., Oguri, K., Fujiwara, Y., Nakanishi, H., Yonekura, H., Kondo, T., Ui, N., Purification and characterization of human platelet proteoglycan. *Biochem J* **233** (1986), 73-81.
- [98] Zahler, S., Kowalski, C., Brosig, A., Kupatt, C., Becker, B. F., Gerlach, E., The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J. Immunol. Methods* **200** (1997), 173-179.
- [99] Olsson, I., Gardell, S., Isolation and characterization of glycosaminoglycans from human leukocytes and platelets. *Biochim Biophys Acta* **141** (1967), 348-357.
- [100] Bode, L., Murch, S., Freeze, H. H., Heparan sulfate plays a central role in a dynamic in vitro model of protein-losing enteropathy. *J Biol Chem* **281** (2006), 7809-7815.
- [101] Taylor, K. R., Gallo, R. L., Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb J* **20** (2006), 9-22.
- [102] Sawaguchi, N., Majima, T., Iwasaki, N., Funakoshi, T., Shimode, K., Onodera, T., Minami, A., Extracellular matrix modulates expression of cell-surface proteoglycan genes in fibroblasts. *Connect Tissue Res* **47** (2006), 141-148.
- [103] Maccari, F., Gheduzzi, D., Volpi, N., Anomalous structure of urinary glycosaminoglycans in patients with pseudoxanthoma elasticum. *Clin Chem* **49** (2003), 380-388.
- [104] Hansen, C., Fraiture, B., Rouhi, R., Otto, E., Forster, G., Kahaly, G., HPLC glycosaminoglycan analysis in patients with Graves' disease. *Clin Sci (Lond)* **92** (1997), 511-517.
- [105] Mita, K., Ichimura, S., James, T. C., Highly repetitive structure and its organization of the silk fibroin gene. *J Mol Evol* **38** (1994), 583-592.

- [106] Campbell, P., Jacobsson, I., Benzing-Purdie, L., Roden, L., Fessler, J. H., Silk - a new substrate for UDP-d-xylose:proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *Anal Biochem* **137** (1984), 505-516.
- [107] Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1** (1986), 263-273.
- [108] Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (1977), 5463-5467.

9 Publikationen und Präsentationen

9.1 Publikationen

1. Pönighaus, C., **Ambrosius, M.**, Casanova, J.C., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J.D., Kleesiek, K., Götting, C., Human xylosyltransferase II is involved in the biosynthesis of the uniform tetrasaccharide linkage region in chondroitin sulfate and heparan sulfate proteoglycans. J Biol Chem 2007 Feb 23;**282(8)**:5201-6.
2. Prante, C., Milting, H., Kassner, A., Farr, M., **Ambrosius, M.**, Schön, S., Seidler, D.G., Banayosy, A.E., Körfer, R., Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Transforming growth factor beta1-regulated xylosyltransferase I activity in human cardiac fibroblasts and its impact for myocardial remodeling. J Biol Chem 2007 Sep 7;**282(36)**:26441-9.
3. **Ambrosius, M.**, Kleesiek, K., Götting, C., Quantitative determination of the glycosaminoglycan Δ -disaccharide composition of serum, platelets and granulocytes by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A 2008 Aug 1;**1201(1)**:54-60.
4. **Ambrosius, M.**, Kleesiek, K., Götting, C., The xylosyltransferase I gene polymorphism c.343G>T (p.A115S) is associated with decreased serum glycosaminoglycan levels. Clin Biochem 2008 (im Druck).
5. **Ambrosius, M.**, Kleesiek, K., Götting, C., Quantitative determination and comparison of the glycosaminoglycan Δ -disaccharide composition in 22 different human cell lines (Manuskript eingereicht).

9.2 Kongressbeiträge und Posterpräsentationen

1. Prante, C., Müller, B., Milting, H., Kassner, A., Bahr, C., Busch, S., Carrera, J., **Ambrosius, M.**, Kuhn, J., Kleesiek, K., Götting, C., Impact of xylosyltransferase I for the remodeling of the ECM during cardiac fibrosis, 17th Joint meeting of glycobiology. 05th - 07th November 2006, Bruges - Belgium.

2. **Ambrosius, M.**, Kleesiek, K., Götting, C., A novel and versatile method for the quantification of glycosaminoglycan disaccharides. Gemeinsamer Kongress der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC) und der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). 19. - 22. September 2007, Vienna - Austria.
3. Pönighaus, C., **Ambrosius, M.**, Carrera Casanova, J., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J. D., Kleesiek, K., Götting, C., Involvement of xylosyltransferase II in the biosynthesis of proteoglycans. Gemeinsamer Kongress der Österreichischen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin und Klinische Chemie (ÖGLMKC) und der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). 19. - 22. September 2007, Vienna - Austria.
4. **Ambrosius, M.**, Kleesiek, K., Götting, C., Analysis and quantification of glycosaminoglycan Δ -disaccharides from platelets, granulocytes and erythrocytes by reversed-phase HPLC. 18th Joint meeting of glycobiology. 04th - 06th November 2007, Lille-Lesquin - France.
5. **Ambrosius, M.**, Kleesiek, K., Götting, C., Analysis and quantification of glycosaminoglycan Δ -disaccharides from serum and erythrocytes by HPLC. 5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). 21. - 24. September 2008, Mannheim - Germany.
6. Pönighaus, C., **Ambrosius, M.**, Carrera Casanova, J., Prante, C., Kuhn, J., Esko, J. D., Schnölzer, M., Kleesiek, K., Götting, C., Xylosyltransferase complements show evidence for the involvement of xylosyltransferase II in the biosynthesis of proteoglycans. 5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). 21. - 24. September 2008, Mannheim - Germany.

9.3 Kongressvorträge

7. **Ambrosius, M.,** Kleesiek, K., Götting, C., Separation of glycosaminoglycan-derived disaccharides labeled with AMAC by reversed-phase HPLC. 17th Joint meeting of glycobiology. 05th - 07th November 2006, Bruges - Belgium.